

Institut für Zuchthygiene der Veterinärmedizinischen Fakultät  
der Universität Zürich  
Direktor: Prof. Dr. K. Zerobin

---

# Embryotransfer zur Gewinnung keimfreier Mäuse

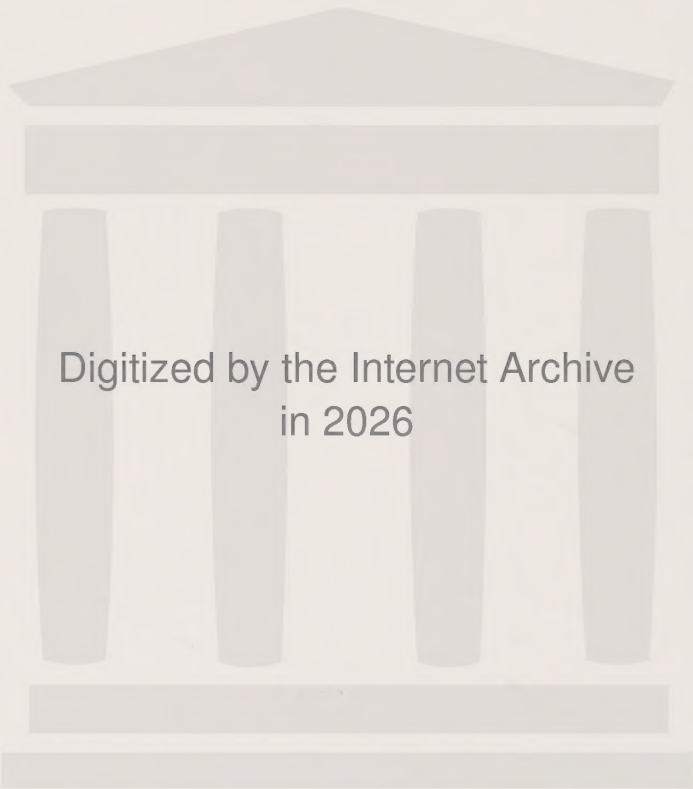
Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Veterinärmedizinischen Fakultät  
der Universität Zürich

vorgelegt von  
WERNER SPÖRRI  
Tierarzt von Bäretswil ZH

Genehmigt auf Antrag von  
Prof. Dr. P.E. Thomann, Referent  
Prof. Dr. K. Zerobin, Korreferent

---

Zürich 1987  
Zentralstelle der Studentenschaft



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

Institut für Zuchthygiene der Veterinärmedizinischen Fakultät  
der Universität Zürich  
Direktor: Prof. Dr. K. Zerobin

---

# Embryotransfer zur Gewinnung keimfreier Mäuse

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Veterinärmedizinischen Fakultät  
der Universität Zürich

vorgelegt von  
WERNER SPÖRRI  
Tierarzt von Bäretswil ZH

Genehmigt auf Antrag von  
Prof. Dr. P.E. Thomann, Referent  
Prof. Dr. K. Zerobin, Korreferent

---

Zürich 1987  
Zentralstelle der Studentenschaft



MEINEN ELTERN  
UND VRENI



|                                            | Seite     |
|--------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Einleitung und Problemstellung</b>   | <b>7</b>  |
| <b>2. Literaturübersicht</b>               | <b>9</b>  |
| 2.1 Sexualzyklus der Maus                  | 9         |
| 2.2 Embryotransfer bei der Maus            | 11        |
| 2.3 Synchronisation                        | 15        |
| 2.4 Vasektomie                             | 16        |
| 2.5 Frühembryonale Entwicklung             | 18        |
| <b>3. Material</b>                         | <b>21</b> |
| 3.1 Versuchstiere                          | 21        |
| 3.2 Apparate und Geräte                    | 23        |
| 3.3 Reagenzien                             | 27        |
| <b>4. Methoden</b>                         | <b>29</b> |
| 4.1 Vasektomie                             | 29        |
| 4.2 Verpaarung, Synchronisation            | 30        |
| 4.3 Embryotransfer                         | 31        |
| 4.3.1 Vorbereitungen                       | 31        |
| 4.3.1.1 Schleusungen                       | 31        |
| 4.3.1.2 Instrumente, Geräte und Reagenzien | 31        |
| 4.3.1.3 Vorbereitungen am Operationstag    | 32        |
| 4.3.2 Operation                            | 36        |
| 4.3.2.1 Entnahme der Eileiter              | 36        |
| 4.3.2.2 Spülung                            | 37        |
| 4.3.2.3 Narkose der Empfängertiere         | 38        |
| 4.3.2.4 Operation der Empfängertiere       | 38        |
| 4.4 Embryonen                              | 40        |
| 4.4.1 Mikroskopische Beurteilung           | 40        |
| 4.4.2 Vitalfärbung                         | 40        |

|       |                                               |           |
|-------|-----------------------------------------------|-----------|
| 4.5   | Kontrollen                                    | 42        |
| 4.5.1 | Mikrobiologische Kontrolle                    | 42        |
| 4.5.2 | Genetische Kontrolle                          | 43        |
| 4.5.3 | Jungtiere, Aufzucht                           | 44        |
| 4.5.4 | Zuchtpaare, Nachzucht                         | 45        |
| 4.6   | Hysterektomie                                 | 45        |
| 5.    | <b>Resultate</b>                              | <b>47</b> |
| 5.1   | Vasektomie                                    | 47        |
| 5.2   | Verpaarung, Synchronisation                   | 48        |
| 5.3   | Embryotransfer                                | 52        |
| 5.4   | Embryonen                                     | 57        |
| 5.5   | Kontrollen                                    | 58        |
| 5.5.1 | Mikrobiologische Kontrolle                    | 58        |
| 5.5.2 | Genetische Kontrolle                          | 61        |
| 5.5.3 | Jungtiere, Aufzucht                           | 61        |
| 5.5.4 | Zuchtpaare, Nachzucht                         | 63        |
| 5.6   | Hysterektomie                                 | 64        |
| 6.    | <b>Diskussion</b>                             | <b>65</b> |
| 6.1   | Resultate des Transfers                       | 65        |
| 6.2   | Mikrobiologie                                 | 68        |
| 6.3   | Vergleich zwischen Transfer und Hysterektomie | 72        |
| 6.4   | Schlussfolgerungen                            | 74        |
| 7.    | <b>Zusammenfassung</b>                        | <b>75</b> |
| 8.    | <b>Literaturverzeichnis</b>                   | <b>77</b> |
| 9.    | <b>Verdankungen</b>                           | <b>87</b> |
| 10.   | <b>Lebenslauf</b>                             | <b>89</b> |

## 1. Einleitung und Problemstellung

Seitdem es HEAPE 1890 in Cambridge das erste Mal gelungen war, beim Kaninchen einen Embryotransfer, d.h. die Uebertragung von befruchteten Eizellen auf ein pseudogravidem Empfängertier durchzuführen, wurde diese Technik auch bei anderen Tierarten erprobt, ohne jedoch den gewünschten Erfolg zu zeigen.

Erst nach dem 2. Weltkrieg, als die künstliche Besamung bei Kühen ihren Siegeszug antrat, lebte der Gedanke an ein weibliches Gegenstück, den Embryotransfer (ET), wieder auf [19]. In der Folge machte der ET enorme Fortschritte, wobei er bei den einzelnen Tierarten unter ganz verschiedenen Gesichtspunkten angewandt wurde.

So hoffte man bei Kühen die Verbreitung von besonders wertvollem, weiblichem Erbgut durch Superovulation und nachfolgenden ET zu fördern und damit den Zuchtfortschritt zu beschleunigen [11,19,65]. Beim Menschen wiederum konnte man dank In-vitro-Fertilisation und ET kinderlosen Eltern den Wunsch nach einem eigenen Kind erfüllen [79].

In der medizinischen Forschung eröffnet der ET weitere Möglichkeiten, vorwiegend in Embryologie, Virologie, Toxikologie, Zwillingsforschung und Gentechnologie [20,84].

In der vorliegenden Arbeit steht folgender Gedanke im Vordergrund:

Die Abteilung für Labortierkunde ist ein Dienstleistungsbetrieb, der die Institute der Universität Zürich mit genetisch und mikrobiell definierten Tieren beliefert. Der genetische Status unterliegt jedoch Veränderungen. Auch innerhalb eines Inzuchtstammes kommt es im Laufe der Jahre zu einer genetischen Drift, die namentlich durch das Ausscheiden von Tieren aus der Zucht (schlechte Wurfzahlen, Aufzuchtverluste, etc.) und durch Mutationen bedingt ist [29,37]. Zudem besteht bei jeder Zucht-

anlage das Risiko einer genetischen Kontamination durch Einkreuzen eines phänotypisch gleichen Tieres (z.B. BALB/c in A/J)[37]. HEDRICH und KLUGE [35] führen die Mehrzahl der Fälle genetischer Veränderungen auf solche Kontaminationen zurück, die sich im Laufe der Zeit summieren und zu gewichtigen Abweichungen innerhalb eines Mäusestammes führen können (Sublinienbildung). Dadurch ist es nicht mehr möglich, die Versuchsergebnisse früherer Jahre zu reproduzieren und mit aktuellen Ergebnissen zu vergleichen.

Um einen bestimmten genetischen Status über längere Zeit zu garantieren, muss deshalb genau definiertes Erbgut konserviert werden können. Dies ist zur Zeit nur auf der Stufe von befruchteten Eizellen möglich, die eingefroren, wiederaufgetaut und nach einer Vitalitätskontrolle auf pseudogravide Tiere übertragen werden (ET)[53]. Dies blieb bis anhin grösseren Zuchtanstalten (z.B. Jackson Laboratories) vorbehalten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Technik des ET an der Abteilung für Labortierkunde zu etablieren und Aufwand und Ertrag gegeneinander abzuwägen.

In einem weiteren Schritt wurde die Technik verbessert und modifiziert, so dass es gelang, Embryonen keimfrei zu gewinnen, auf keimfreie Tiere zu übertragen, und so keimfreie Jungtiere zu erhalten.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Sexualzyklus der Maus

Der weibliche Sexualzyklus kann nach verschiedenen Kriterien beurteilt werden, z.B. anhand der Ovulation. So unterscheiden FOX und LAIRD [26]:

- Die induzierte Ovulation (z.B. Katze, Kaninchen, Frettchen), [81] und
- Die spontane Ovulation (z.B. Kuh, Mensch).  
Lebewesen, die spontan ovulieren, können weiter in
  - Östrische Arten (Hauptmerkmal ist die Brunst), z.B. Kuh, und
  - menstruale Arten (Hauptmerkmal ist die Regelblutung), z.B. Menscheingeteilt werden.

Mäuse gehören in die Gruppe der spontan ovulierenden Tiere. Ihr Zyklus wird zusätzlich als polyöstrisch bezeichnet [5,10,13, 26]. Dies bedeutet, dass Mäuse ganzjährig einen regelmässigen Zyklus aufweisen, was sich anhand von Vaginalabstrichen (verhornte Epithelzellen, Leukozyten) und der Deckbereitschaft leicht überprüfen lässt [5,13,26,31,74,80]. Die Zykluslänge beträgt 4 - 6 Tage [5,26,28,67,80,81,92].

Im Unterschied zu anderen zyklischen Tieren weisen Mäuse die Besonderheit auf, dass sich die Thekazellen im Anschluss an die Ovulation nur nach erfolgter Begattung (Ausschüttung von Prolactin erst nach mehrmaligem Deckakt) in funktionsfähige Corpora lutea umwandeln [5,13,26,81]. Fehlt dieser zusätzliche Reiz, so erfolgt unmittelbar nach der Ovulation ein erneutes Heranreifen von Follikeln innerhalb von 4 - 5 Tagen ohne Lutealphase [80,81]. Dies ist mit ein Grund für die sehr hohe Vermehrungsrate von Mäusen.

Nach erfolgter Begattung und Umwandlung der Thekazellen zum Corpus luteum bleibt dieses während 10 - 15 Tagen (durchschnittlich 11 Tagen [13,92], bzw. 13 Tagen [5]) aktiv, was am Auftreten von Leukozyten im Vaginalabstrich erkennbar ist [5, 26,80].

Unterbleibt die Nidation von Embryonen im Uterus (Pseudogravidität), so folgt unmittelbar nach Ablauf der Lutealphase die nächste Brunst.

Die Kopulation wie auch alle übrigen fortpflanzungsbiologischen Geschehnisse spielen sich vorwiegend nach Mitternacht und in den frühen Morgenstunden ab. Dabei ist Licht der entscheidende Zeitgeber [5,10,13,26,67,74,81].

Uebereinstimmend lassen sich folgende zeitlichen Gegebenheiten festhalten:

|              |   |                                             |
|--------------|---|---------------------------------------------|
| Brunstbeginn | : | 22.00 Uhr bis 01.00 Uhr [5,68,74].          |
| Ovulation    | : | 24.00 Uhr bis 03.00 Uhr [5,28,67,74,80,81]. |
| Kopulation   | : | 22.00 Uhr bis 08.00 Uhr [74,80].            |

Die Kopulation ist der Ovulation zeitlich vorgelagert. Dadurch wird den Spermien die Kapazitation ermöglicht [60]. BRADEN [10] fand, dass zwischen Kopulation und Ovulation durchschnittlich fünf Stunden verstreichen, während SNELL et al. [74,75] eine Differenz von zwei bis drei Stunden angaben.

Die Zeit, in der drei Viertel der Eizellen ovulieren, soll 30 Minuten [10] bis eine Stunde betragen [81].

## 2.2 Embryotransfer<sup>1)</sup> bei der Maus

Der Embryotransfer bei der Maus bietet dem Forscher neben dem Nachteil der Kleinheit des Tieres eine ganze Reihe von Vorteilen:

Bei Mäusen ovulieren schon physiologischerweise viele Eizellen, d.h. eine Superovulation erübrigt sich in den meisten Fällen. Mit der kurzen Trächtigkeitsdauer von 3 Wochen und einem Generationenintervall von 6 - 8 Wochen kann der Erfolg, bzw. Misserfolg eines Versuches innert kürzester Zeit abgeklärt werden. Die kurze Versuchsdauer, gekoppelt mit den geringen Kosten für Futter und Haltung, ist auch finanziell attraktiv.

---

1) Neuere Bestrebungen, die Transfer-Nomenklatur präziser zu fassen, schlagen folgende Bezeichnungen vor:

- Für den von der Zona pellucida umhüllten, aus Blastomeren bestehenden Zellhaufen, soll neu der Begriff "Sphaeridion" (griechisch: die Kugel) gewählt werden. Die Zahl der im Sphaeridion vorhandenen Blastomeren kann, bei regelmässiger Teilung, durch Exponentendarstellung ( $2^n$ ) angegeben werden.

Das 8-Zell-Stadium entspräche dem  $2^3$ -Sphaeridion.

- Embryotransfer soll durch den Begriff "Germioplazenttransfer" ersetzt werden, weil beim Embryotransfer nicht der Keimling allein, sondern auch die Zellen, die sich zu den Ernährungshüllen (Amnion, Chorion) entwickeln, übertragen werden [90].

In dieser Arbeit wird der gebräuchlichere Ausdruck "Embryotransfer" verwendet. Als "Embryonen" werden alle nicht näher definierten Embryonalstadien bezeichnet. "Eizelle" bleibt der unbefruchteten Eizelle vorbehalten.

### 2.2.1 Geschichtlicher Rückblick

Der erste Embryotransfer bei der Maus gelang nach Literaturangaben [22,56] im Jahre 1935 durch LITTLE.

In den fünfziger Jahren dieses Jahrhunderts fanden entscheidende Untersuchungen über diese Technik statt (FEKETE und LITTLE (1942)[22], BEATTY (1951)[4], RUNNER (1951)[66], BOOT und MUEHLBOCK (1953)[9], McLAREN und MICHIE (1956)[56], (1958)[57], TARKOWSKI (1959)[76]. Dabei wurden verschiedene Verfahren entwickelt, wobei man

- blutige (operative) Eingriffe und
- unblutige d.h. (transzervikale) Uebertragungen [59,76].

unterscheidet.

Im allgemeinen wurde mit der operativen Methode gearbeitet [22, 55,56,57,76,83,87]. Durch Eröffnen der Flanke und nach Vorlagern von Ovar, Eileiter und Uterus wurden die Embryonen direkt entweder in die Bursa ovarica [66], in den Eileiter [76,82,83], oder, was am einfachsten ist, in den Uterus [22,56,57,83,87,92] verbracht. Am schwierigsten ist sicherlich die Uebertragung in den Eileiter, da hier die Operation unter dem Stereomikroskop ausgeführt werden muss [76].

Das transzervikale Verfahren, das durch seine relative Einfachheit besticht, hat den Nachteil, dass die Erfolgsrate meist klein ist [4,76]. Als Grund wird der Verlust von Embryonen durch die eröffnete Zervix angegeben [76]. Neuere Untersuchungen mit dieser Methode sollen den operativen Techniken vergleichbare Resultate bringen [59].

Ausgedehnte Untersuchungen wurden über die Notwendigkeit absoluter Synchronisation zwischen Spender- und Empfängertieren angestellt. So haben McLAREN und MICHIE [56] bei Uebertragungen in den Uterus alle Kombinationen zwischen +3 und -3 Tagen ausprobiert.

Ihre Untersuchungen ergaben, dass die Synchronisation nicht absolut sein muss. Ein kleiner zeitlicher Vorsprung der Embryonen gegenüber dem Endometrium des Empfängertieres soll sich auf die Ergebnisse positiv auswirken, weil diese nach erfolgtem Transfer einen Stillstand in ihrer Entwicklung durchmachen, der einen halben bis einen ganzen Tag dauern soll [76].

Als beste Kombination bezeichneten McLAREN und MICHIE [56] das Uebertragen von 3 1/2 Tage alten Blastozysten auf 2 1/2 Tage lang pseudogravide Empfängertiere.

Ist das Endometrium weiter entwickelt als die Embryonen, vergrößert sich aus obgenannten Gründen die Abweichung zur Synchronisation um einen weiteren halben bis ganzen Tag. Trächtigkeiten resultierten bei einer derart verschobenen Synchronisation in keinem Fall [56].

Welche Entwicklungsstadien an welchen Ort übertragen werden können, ist ein weiteres, wichtiges Kriterium. Allgemein gilt, dass für die Uebertragung an eine bestimmte Stelle diejenigen Stadien verwendet werden sollten, die sich auch physiologischerweise an dieser Stelle befinden. (Vergleiche 2.5 Frühembyonale Entwicklung.) So können Embryonen ab dem 8-Zell-Stadium in den Uterus, im 2-Zell- bis 8-Zell-Stadium in den Eileiter und im 2-Zell-Stadium in die Bursa ovarica übertragen werden.

Um die Chancen einer Uebertragung zu erhöhen, versuchte man, vor einem Transfer die nicht geeigneten Embryonen zu entfernen. Obwohl sich die frühen Embryonalstadien der Maus (bis 8-Zell-Stadium) mikroskopisch gut untersuchen lassen (WHITTINGHAM [85]), bleibt die Aussagekraft begrenzt. So starben morphologisch einwandfreie Embryonen nach dem Transfer ab, wogegen morphologisch abweichende zu völlig normalen Graviditäten und Jungtieren führten [18,63]. HAHN [32] betrachtet die Entwicklungsfähigkeit eines Embryos als wesentliches Qualitätsmerkmal. Nur Embryonen in dem für den jeweiligen Tag charakteristischen

Stadium sind für einen Transfer geeignet. Andere Stadien stammen entweder aus einer verzögerten Ovulation oder zeigen Degenerationsanzeichen, d.h. sie hatten den Selektionsprozess bis zu diesem Zeitpunkt nur schlecht überstanden.

Weitere Möglichkeiten zur Ueberprüfung der Vitalität von Embryonen bestehen in deren Kultivierung oder in der Messung ihres Stoffwechsels. Diese Verfahren führen zu eindeutigeren Ergebnissen, sind jedoch mit einem zusätzlichen Aufwand verbunden [61,85].

Die gelungene Kryokonservierung von 8-Zell-Stadien und Blastozysten durch WHITTINGHAM [83] im Jahre 1971, WHITTINGHAM und WHITTEN [86] und durch WILMUT [88] stellte einen Meilenstein in der Entwicklung des ET dar, und eröffnete weitere Anwendungsmöglichkeiten. Dadurch konnte neu neben männlichem (Sperma) auch weibliches Erbgut konserviert werden (Embryonenbank)[53, 89].

### 2.2.2 Anwendungsmöglichkeiten

Während es bei Nutztieren finanzielle Ueberlegungen waren, welche die Zuchtverbände zur Zusammenarbeit mit den verschiedenen Arbeitsgemeinschaften für Embryotransfer bewogen (mehr Nachkommen, raschere Nachzuchtprüfung, erhöhte Produktion und Milchleistung durch Frühnutzung, Vornutzung, Zuchtverbesserung [11, 65]), blieb der ET bei der Maus auf der Stufe der Grundlagenforschung stehen [84]. Dort dient er als Mittel zum Zweck, um andere Fragestellungen abzuklären. Schon FEKETE und LITTLE [22] berichteten im Jahr 1942 über den Einsatz des ET bei der Abklärung der Uebertragbarkeit und Häufigkeit von Tumoren bei Mäusestämmen.

Bereiche, in denen der Embryotransfer vorwiegend als methodischer Hilfsschritt eingesetzt wird, sind:

- Grundlagenforschung Embryologie, Physiologie [91]
- Einfluss des Feten (Genotyp) gegenüber Einflüssen aus der mütterlichen Umgebung (Endometrium) [59,66,87]
- Fetal-maternale Regelkreise (z.B. Endokrinologie) [11]
- Untersuchungen über Spermien (z.B. Kapazitation) [43]
- In-vitro-Fertilisation [70,82]
- Eizell-Kultivierung [11,55,84]
- Krebsforschung [22]
- Sanitarische Aspekte (z.B. intrauterine Erkrankungen) [7,30, 52,78]
- Geschlechtsdifferenzierung [33,73]
- Interspezies-intrauterine Toleranz [2,14,44]
- Mikromanipulationen (Klonierung/Chimärenbildung/Genmanipulation) [12,27]
- Konservierung von genetischem Material, spez. auch Material von Zuchttieren oder von bedrohten Tierarten [11,86,89].

### 2.3 Synchronisation

Voraussetzung für einen erfolgreichen ET ist eine enge Zyklus-synchronisation von Spender- und Empfängertieren. Nur dann ist gewährleistet, dass sich die übertragenen Embryonen im Uterus implantieren können (siehe 2.2 Embryotransfer bei der Maus). Während beim Rind die Synchronisation durch Applikation von Hormonen erreicht wird [19], gelingt dies bei Mäusen mittels Whitten-Effekt:

Werden Mäuseweibchen von Männchen getrennt gehalten, so wird der regelmässige Zyklus unterdrückt, die Tiere werden anöstrisch [13,80,81,92]. Nach Zusetzen eines Männchens wird das Zyklusgeschehen wieder aktiviert, so dass in der Nacht zum 3. Tag eine grosse Anzahl der Weibchen in Brunst, und somit deckbereit ist [26,80,81].

Der gleiche Effekt kann auch dadurch erreicht werden, dass die Weibchen in einen Käfig verbracht werden, in dem kurz vorher noch ein Männchen war, oder dadurch, dass ein Männchen in einem separaten Drahtkäfig in einen Käfig mit Weibchen gestellt wird [80].

Die Untersuchungen von WHITTEN [80] ergaben, dass es sich um Pheromone adulter, männlicher Tiere handelt, die nach Ausscheidung im Urin und einer Einwirkzeit von 48 Stunden [80] eine erneute Brunst induzieren. Aller Wahrscheinlichkeit nach werden diese Stoffe von olfaktorischen Rezeptoren wahrgenommen, die ihrerseits die Sekretion von FSH und damit das Follikelwachstum in den Ovarien stimulieren [80]. Die chemische Struktur dieser Pheromone ist im einzelnen noch nicht bekannt.

Die Zyklusbestimmung erfolgt am nächsten Morgen anhand der Pfropfkontrolle: Weibchen, die in der Nacht gedeckt wurden, besitzen morgens einen Vaginalpfropf, der weisslich bis leicht gelblich gefärbt ist und die ganze Scheide ausfüllt [16]. Durch Hochheben des Schwanzes kann er leicht festgestellt werden. Kleine Pfröpfe lassen sich mit Hilfe eines Spatels, der in die Scheide eingeführt wird, auch palpieren.

Der Pfropf besteht aus koagulierten Bestandteilen des Ejakulates, besonders der Samenblasen, Koagulationsdrüsen und der Prostata, die zum Teil mit Spermien und Vaginalzellen (Epithelzellen) vermischt sind [16,63,80]. Er bildet sich schon wenige Minuten nach dem Deckakt, haftet stark und fällt normalerweise erst nach 18 - 48 Stunden aus seiner Verankerung [5,13,16,28,80].

Das Vorhandensein eines Vaginalpfropfes gilt nicht als Zeichen einer Befruchtung, sondern nur für einen stattgefundenen Deckakt. Im allgemeinen werden 80 - 90% der gedeckten Tiere trächtig [13,56,57,67]. In Einzelfällen wurden Trächtigkeitsraten bis zu 98% beobachtet [16].

## 2.4 Vasektomie

Wie unter 2.1 erwähnt, bilden sich die Thekazellen erst nach erfolgter Begattung in funktionsfähige Corpora lutea um. Da einerseits ein Uterus nicht beliebig viele Embryonen aufnehmen kann und andererseits auch die Kontrolle über die Herkunft der Jungen unabdingbar ist, werden die Empfängerweibchen durch vasektomierte Böcke gedeckt [59,63,76,92].

Diese unterbundenen Böcke werden einer doppelten Kontrolle unterzogen:

- Kontrolle der Sterilität der unterbundenen Männchen durch Verpaarung mit virginellen Weibchen. Es dürfen keine Jungen geboren werden.
- Verwendung von Empfängertieren, die sich in der Fellfarbe von den Spendertieren unterscheiden [55,56,57,63,76]. So werden z.B. Embryonen von DBA-Tieren (grau) und C57BL/6 (schwarz) auf Albinomäuse übertragen. Die geborenen Jungen können anhand der Fellfarbe eindeutig als Jungtiere des jeweiligen Stammes identifiziert werden.

Eine weitergehende Kontrolle mittels Hauttransplantationen, Skelettvermessungen oder biochemischer Tests [35,36,37] zum Ausschluss einer evtl. Hybridisierung, bzw. Chimärenbildung durch genetisches Material der Empfängerweibchen kann entfallen, da z.B. beim Rind keine erhöhte Rate nachgewiesen wurden. Chimärenbildung kann auch unter natürlichen Bedingungen vorkommen, z.B. durch Dispermie, Aggregation von Embryonen oder der gleichzeitigen Befruchtung von Ovum und Polkörper durch zwei Spermien mit anschliessender Entwicklung beider Zelllinien [12]. Die Häufigkeit einer Di- oder Polyspermie ist vor allem bei älteren Eizellen erhöht [13,21,31,54].

Für die Operation werden vorzugsweise Männchen im Alter zwischen sechs bis acht Wochen verwendet [92]. Dieses Alter eignet sich aus folgenden Gründen:

- Die Pubertät ist abgeschlossen, die sexuelle Aktivität dagegen noch nicht voll entwickelt.
- Die Tiere haben gewisse Reserven (Kreislauf, Ernährung), sind aber noch nicht verfettet.

Auszuchttiere eignen sich besser als Inzuchttiere, da sie vielfach grösser und vitaler sind und deswegen grössere Pfröpfe bilden. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die Qualität des Pfropfes keinen Rückschluss auf die spätere Entwicklung der übertragenen Embryonen zulässt. Hingegen erleichtert ein grosser Pfropf das Erkennen der gedeckten Tiere, d.h. die Pfropfkontrolle kann ohne Spatel erfolgen.

## 2.5 Frühembryonale Entwicklung

Die Kopulation und anschliessende Ovulation findet, wie bereits erwähnt, in der Nacht statt. Je nach Literaturangabe wird der Tag des Vorhandenseins des Vaginalpfropfes als Tag 0 oder Tag 1 der Gravidität bezeichnet. In dieser Arbeit wird der Tag des Vaginalpfropfes dem Tag 1 gleichgesetzt.

Während einer Brunst ovulieren je nach Stamm 6 bis 15 Eizellen [26,63,92]. In Einzelfällen wurden bis zu 21 Junge geboren [28]. Die Befruchtung findet in der Ampulle statt [13,21,31,75]. Nach Änderung des Oestrogen-Progesteron-Verhältnisses, bedingt durch die Sezernierung von Progesteron durch die Corpora lutea, verlaufen die Tuben- und Uteruskontraktionen mehrheitlich tubozervikal [93], wodurch die Embryonen in den Uterus befördert werden. Diesen erreichen sie am dritten Tag im 8-Zell-Stadium [63,92]. Das Morula-Stadium wird noch am gleichen Tag erreicht, und am vierten Tag schlüpft der Embryo als Blastozyste aus der Zona pellucida [21,92]. Am fünften Tag findet die Implantation statt [13,75,80,92].

Vorzeitiger oder zu später Uebertritt in den Uterus führt zur

Degeneration der Embryonen [31,62]. Nach SNELL et al. [75] ist die erfolgversprechende Zeit des Uebertritts auf 3 1/4 - 4 1/4 Tage post coitum beschränkt. McLAREN und MICHIE [56] führen dies auf den Zustand des Endometriums zurück, welches nur während einer kurzen Uebergangszeit zur Implantation befähigt ist.

Ovulation, Eizelltransport sowie Implantation werden vor allem durch die beiden Sexualhormone Oestrogen und Progesteron gesteuert, die im richtigen Verhältnis, bzw. in ihrer richtigen zeitlichen Abfolge nicht antagonistisch, sondern, was die Entwicklung der Feten anbelangt, synergistisch wirken [60]. So kommt es unter Oestrogeneinfluss zu einer Proliferation des Endometriums, während Progesteron anschliessend die Drüsenzellen des Uterusepithels zur Sekretion aktiviert [13,21,31,60].

An den Stellen, an denen sich die Blastozysten an das Endometrium anlagern, kommt es zur sogenannten dezidualen Reaktion. Dabei hypertrophieren die Fibroblasten des Stromas, es kommt zu einer lokalen Anschwellung [21]. Histologisch lässt sich zusätzlich ein Oedem feststellen, was dem ganzen ein schwammartiges Aussehen verleiht.

Die gleiche Reaktion kann auch artifiziell durch Verletzung des Uterus zu einem bestimmten Zeitpunkt ausgelöst werden. Dabei kommt es zur Ausbildung plazentaähnlicher Tumoren, sog. Dezi-duomata [5,21]. Am sichersten kann dieses Geschehen bei Mäusen am fünften Tag der Trächtigkeit initiiert werden. Es besteht somit eine Koinzidenz mit der physiologischerweise am fünften Tag stattfindenden Implantation der Blastozysten [60].

Die Wichtigkeit, dass Embryonen zum richtigen Zeitpunkt in den entsprechend vorbereiteten Uterus übertreten müssen, kann nicht genügend betont werden, da die Implantation die heikelste Phase der embryonalen Entwicklung darstellt.

Die "normale" pränatale Mortalität beträgt je nach Stamm 15 bis 50% [28,38,40,45,56] und kann wie folgt unterteilt werden:

### Präimplantive Verluste:

Sie entsprechen der Differenz der Corpora lutea (= abgegebene Eizellen) und der Anzahl der Implantationsstellen. Es handelt sich dabei um unbefruchtete Eizellen und um Entwicklungsstadien von der Zygote bis zur Blastozyste, die vor der Implantation zugrunde gehen [38,69,87].

Für den Stamm C57BL/6 werden Zahlen von 0 - 27% übermittelt [38,87], für den Stamm DBA/2J sind es 16,9% [38].

### Resorptionen:

Unter diesem Begriff werden die in der frühen Trächtigkeit abgestorbenen Keime zusammengefasst. Bei der Sektion lassen sich Reste von Implantationsstellen, ohne erkennbare embryonale Struktur feststellen [45]. 48 - 100% der Resorptionen finden in der postimplantativen Entwicklungsphase statt und stellen eigentliche Implantationsstörungen dar. Zeitlich entspricht dies dem 8. und 9. Trächtigkeitstag [40,45,57,87,91].

HEINECKE [38] ermittelte für den Stamm C57BL/6 11,4% und für den Stamm DBA/2J 29,1% Resorptionen, von denen 90% bzw. 80% in die postimplantive Phase fielen.

Tabelle 1: Frühembryonale Entwicklung

| Stadium      | Zeit             |                   | Ort der Gewinnung  |
|--------------|------------------|-------------------|--------------------|
|              | RAFFERTY<br>[63] | ZEILMAKER<br>[92] |                    |
| 1-Zell       | 2 - 30 h         | 1. Tag            | Ampulle            |
| 2-Zell       | 24 - 57 h        | 2. Tag            | Ampulle / Eileiter |
| 4-Zell       | 44 - 59 h        | 2. - 3. Tag       | Eileiter           |
| 8-Zell       | 50 - 64 h        | 3. Tag            | Eileiter / Uterus  |
| Morula       | 60 - 75 h        | 3. - 4. Tag       | Uterus             |
| Blastozyste  | 74 - 82 h        | 4. - 5. Tag       | Uterus             |
| Implantation |                  | 5. Tag            | Uterus             |

### 3. Material

#### 3.1 Versuchstiere

##### 3.1.1 Spendertiere

Für die Untersuchungen wurden Mäuse der Stämme C57BL/6J/Zur, DBA/2J/Zur und BALB/cByJ/Zur verwendet. Die Tiere stammten aus der hauseigenen Zucht der Abteilung für Labortierkunde (AfL) der Universität Zürich.

Zum Zeitpunkt der Spülung waren die virginellen Weibchen durchschnittlich 12,6 (10 bis 15) Wochen alt.

Die Männchen kamen im Alter von 12 bis 14 Wochen erstmals zum Einsatz, durchschnittlich fünfmal. Bei Versuchsende waren sie jeweils 19 Wochen alt.

Alle Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen (relative Luftfeuchtigkeit 60%±5%, Temperatur 22,5±0,5°C, 14:10 Stunden hell:dunkel) gehalten. Die Dämmerung wurde durch stufenweises Ein- und Ausschaltens der Lampen innert einer Stunde simuliert.

Die männlichen Tiere wurden in Einzelhaltung, die weiblichen in Gruppen zu 15 in einem Makrolonkäfig Typ II (23 x 17 x 14 cm), bzw. Typ III (39 x 23 x 15 cm) gehalten. Die Adaptationszeit an die Laboratoriumsverhältnisse betrug 2 - 3 Wochen. Die Käfige waren mit staubfreier Einstreu (Laborex) gefüllt, ein pelletiertes Alleinfutter der Firma NAFAG\*) und Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung.

\*) NAFAG-Nr. 850: Mäuse- und Rattenzucht-Alleinfutter

Zusammensetzung laut Firmenangabe:

Roheiweiss 24,8%, Rohfett 5,6%, Stärke 36%, Rohfaser 3,8%, Rohasche 6,0%.

### 3.1.2 Empfängertiere

Als Empfängertiere dienten Auszuchttiere des Stammes Zur:ICR. Sie wurden in keimfreien Isolatoren an der AfL gezüchtet.

Zum Operationszeitpunkt waren die virginellen Weibchen durchschnittlich 12,1 Wochen alt. (Extremwerte: 11 bzw. 14 Wochen.)

Die zur Erzeugung von pseudograviden Weibchen benötigten Männchen wurden im Alter von 8 bzw. 10 Wochen unterbunden. 8 Wochen später, d.h. im Alter von 16 bis 18 Wochen, kamen sie, nach Abschluss der Kontrollen (siehe 2.4 Vasektomie), zum ersten Einsatz (Transfer Nummer 1). Das Decken erfolgte anschliessend einmal wöchentlich.

Die Haltungsbedingungen im Isolatorenraum waren mit  $62,5 \pm 5\%$  relativer Luftfeuchtigkeit, einer Temperatur von  $21,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  und einem 13:11 Stunden dauernden Hell:Dunkel-Wechsel gegeben.

Die Tiere selber wurden in Makrolonkäfigen des Typs II (Masse 23 x 17 x 14 cm), auf staubfreier Einstreu (Laborex) gehalten. Sie erhielten hitzesterilisiertes Futter der Firma NAFAG\*), welches ihnen zusammen mit Wasser ad libitum zur Verfügung stand.

Die Versuche wurden in der Zeit von Januar bis Mai 1986 durchgeführt.

\*) NAFAG - Nr. 857: Mäuse- und Rattenzucht-Alleinfutter (DVOD) Hitzesterilisierbares Alleinfutter für Zucht- und Jungtiere. Nährstoffgehalt wie bei NAFAG Nr. 850, jedoch mit einem verdoppelten Vitamingehalt, mit Ausnahme von Vitamin D, da bei der Hitzebehandlung die thermolabilen Vitamine um rund die Hälfte inaktiviert werden (NAGAG-Merkblatt IV.857).

### 3.2 Apparate und Geräte (des keimfreien Transfers)

#### Für die Züchtung und Verpaarung

- 6 Isolatoren, aus PVC-Folie, 600 x 600 x 1500mm  
(Metall und Plastic GmbH, No. 1020)
- 8 Trennbleche, aus Lochstahlblech, 1 mm dick, Durchmesser der  
Löcher 10 mm, Eigenfabrikat.  
Die Bleche haben die Form eines längs aufgeschnittenen Makrolonkäfigs Typ II, und lassen sich so in die Käfige des Typ II einklemmen, dass links und rechts noch eine Flasche und Futter gesteckt werden kann.
- 16 Makrolonkäfige Typ I, (Masse 21,5 x 10,5 x 13 cm). In die  
Käfigwand wurden auf beiden Längsseiten je 24 Löcher gebohrt, Bohrdurchmesser 8 mm.

#### Schleusung (siehe 4.3.1.1)

- 10 Käfige Typ II komplett mit 10 Tränkeflaschen, 1 Pinzette,  
Zellstoffunterlage, Papiersäcke. (Versorgung der Tiere)
- 2 Äthertöpfe, 1 Filtergerät SM 16254 mit eingesetzter Filter-  
membran, 2 Narkosemasken. (Narkose)
- 4 Operationsbestecke, 2 Petrischalen mit Gazetupfern 5x5 cm,  
2 Eppendorfröhrchen mit 0,5%-iger Methylenblaulösung, 1 Pipet-  
tenhalter, 1 Petrischale. (Operation)

#### Für die Entnahme der Eileiter

4 Bestecke bestehend aus:

- 1 Skalpellgriff No.3, BB 73
- 1 Pinzette chirurgisch, gerade, BD 555
- 1 Pinzette gerade, mittelfein, BD 27
- 2 Pinzetten, gebogen, sehr fein, BD 315
- 2 Präparationsscheren (Baby-Metzenbaum), BC 600
- 2 Scheren fein, gerade, spitz, BC 140

### Für die Spülung

2 Bestecke bestehend aus:

- 1 Uhrmacherpinzette, gerade (S&T, JF-5)
- 1 Uhrmacherpinzette, abgewinkelt (S&T, JF-5b)
- 1 Pinzette nach Pierse (S&T, JFLP-3)

1 Zoom-Stereomikroskop (Wild M8)

1 Mikroschere Vannas (Hebu, Augeninstrumente)

2 Spritzen à 2 ml, Luer - Lock (Calibra)

6 Nadeln (Hamilton, Aussendurchmesser 0,6 mm)

Zellgewebeschälchen 35 x 10 mm, Falcon (B & D, 3001 F)

Arbeitsunterlage, Schweisserglas 8 x 11 cm, Eigenfabrikat

Spüllösung (siehe 3.3 Reagenzien)

### Für die Narkose

2 Äthertöpfe, Glas (autoklavierbar)

1 Narkoseapparat Connel 201 (Janssen GmbH)

1 Filtergerät für Gasfiltration (Sartorius SM 16254)

2 Narkosemasken, Glas, (autoklavierbar), Eigenfabrikat  
Kopfföffnung 16 mm Durchmesser, gemäss Abb. 1

10 Uebertragungspipetten, bestehend aus Silikonschlauch  
und Mikropipetten (aus Pasteurpipetten hergestellt)

### Für die Operation

1 Laminar air flow, Class 100 (Gelaire)

1 Stahlisolator für Hysterektomie, 1520 x 650 x 650 mm  
(Metall + Plastik GmbH, Spezialanfertigung) oder

1 Stahlisolator für Hühnerhaltung, 1800 x 700 x 700 mm  
(Metall + Plastik GmbH, Spezialanfertigung)

Abb. 1. Narkosemaske aus Glas



Abb. 2a. Operationsunterlagen

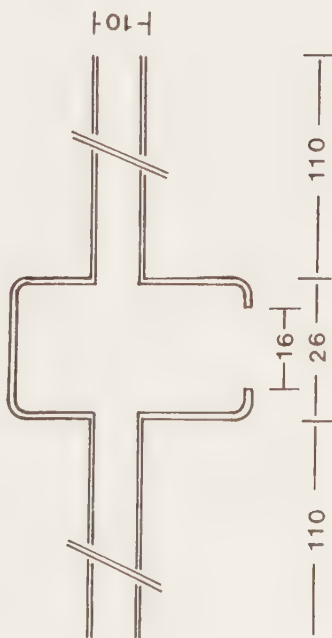


Abb. 2b. Operationstischchen  
(Metallunterlage)



2 Operationsunterlagen aus rostfreiem Stahlblech, Dicke 2 mm  
Masse 400 x 600 x 40 mm, Eigenfabrikat, gemäss Abb. 2a

1 Operationstischchen, Eigenfabrikat, bestehend aus:  
- 1 Metallunterlage aus rostfreiem Stahlblech: 320x250x20 mm  
- 4 Klemmbriden als Halterung für die Narkosemaske  
- 1 Silikonunterlage als Wärmeschutz, 310 x 240 x 3 mm  
- 2 seitlichen Bügeln, Messing, zur Fixation der Maus,  
gemäss Abb. 2b

1 Lupenlampe, Luxo-Regent, Durchmesser 12 cm.

2 Rasierapparate, Wahl-Stylist, Scherkopf 1/10 mm, Akku-  
betrieben. (Kat. Nr.#8900, Frisso AG, CH-8352 Räterschen)

4 Bestecke bestehend aus:

- 1 Skalpellgriff No.3, BB 73
- 1 Pinzette chirurgisch, gerade, BD 555
- 1 Pinzette gerade, mittelfein, BD 27
- 2 Pinzetten gebogen, sehr fein, BD 315
- 1 Präparationsschere (Baby-Metzenbaum), BC 600
- 1 Schere, fein, gerade, spitz, BC 140
- 1 Nadelhalter, S&T, No. 00088/C-14

1 Mundstückhalter, Eigenfabrikat

1 Pipettenhalter, Eigenfabrikat

Gaze-Tupfer, 5 x 5 cm

Gazetupfer, 40 x 40 cm, 16-fach gefaltet

Einmalspritzen à 20 ml, (DIN 13098 20N6)

Tuberkulin-Spritzen à 1 ml, (DIN 1L008)

Nadeln: 0,90 x 40 mm (20G), Terumo

Nadeln: 0,45 x 12 mm (26), Terumo

Klingen: No. 10, (BB 510)

Nahtmaterial: Flanke: Vicryl, 5-0, resorbierbar  
(Ethicon No. V 385)

Haut : Prolene, 6-0, (Ethicon No. 8697)

Filter 47 mm Durchmesser, 0,45 µm, (Millipore, HAWG 04753)

Filter-Spritzenaufsatz (Acrodisc<sup>®</sup>) 27 mm, 0,45 µm Porengrösse

### 3.3 Reagenzien

Die Spülflüssigkeit bestand aus:

- 80 ml PBS (phosphate buffered saline), modifiziert nach Dulbecco (siehe unten)
- 10 ml FCS (fetal calf serum), mycoplasma-screened, sterilfiltriert  
(Firma Amimed AG, CH-4000 Basel, Kat.-No. 14.100.1)
- 1 ml L-Glutamin 200mMol,  
(Firma Amimed AG, CH-4000 Basel, Kat.-No. 12.125.1)

Die drei Flüssigkeiten wurden im Wasserbad auf 30°C erwärmt, und unter leichtem Schwenken miteinander vermengt.

Es wurden keine Antibiotika beigefügt.

#### PBS, modifiziert nach Dulbecco

|                                      |             |
|--------------------------------------|-------------|
| NaCl                                 | 8,000 Gramm |
| KCl                                  | 0,200 Gramm |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>     | 1,150 Gramm |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0,200 Gramm |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 0,100 Gramm |
| CaCl <sub>2</sub>                    | 0,100 Gramm |
| Glucose                              | 1,000 Gramm |
| Na-pyruvat                           | 0,036 Gramm |

pH = 7,40

Die Salze in 1 Liter bidestilliertem Wasser lösen und sterilfiltrieren.

Narkosemittel:

- Methoxyfluran = 2,2-dichlor-1,1-difluor-äthylmethyläther  
(Metofane®)  
(Janssen Pharmaceutica AG, CH-6340 Baar)

Markierung der Uterusperforation:

- Methylenblau-Lösung 0,5%

Desinfektionsmittel:

- Beloran® 200  
(Ciba-Geigy AG, CH-4000 Basel)

Mikrobiologische Kontrolle:

- Fluid Thioglycollate Medium USP  
(BBL Microbiology Systems, No. 11'260)  
(BD & Co., CH-4142 Münchenstein)
- Peressigsäure 40%  
(Oxoid, CH-5000 Aarau)

## 4. Methoden

### 4.1 Vasektomie

Als Narkosemittel wurde Metofane<sup>®</sup> (Jannsen) verwendet. Die Einleitung der Narkose erfolgte im Äthertopf. Nach ca. 2 Minuten 30 Sekunden konnte die Maus an die Narkosemaske angeschlossen werden (Flow 4, 100%). Die Beine und der Schwanz wurden mit einem Gummiband fixiert.

Der Bauch wurde vom Präputium bis zum Sternum rasiert. Mit einem nassen Tupfer wurden die übriggebliebenen, kurzen Haare geglättet und nach lateral gestrichen.

Die Haut wurde kranial des Präputiums ca. 1,5 cm, die Bauchdecke in der Linea alba ca. 1 cm eröffnet.

Die Hoden wurden von aussen aus dem Skrotum in die Bauchhöhle gestossen. Am Fett, das als Anhängsel am Samenleiter befestigt ist, wurden Samenleiter und Hoden extrakorporal verlagert. Der Samenleiter wurde mit den Pinzetten stumpf freipräpariert. Mit einem ausgeglühten, noch heissen Spatel konnte ein Stück von 0,5 bis 1 cm Länge des Samenleiters entfernt werden.

Anschliessend wurde der Hoden caudo-lateral in die Bauchhöhle verbracht.

Der zweite Samenleiter wurde auf gleiche Weise unterbunden.

Anschliessend erfolgte das Nähen der Bauchdecke (Schmiedennaht, Vicryl 5-0) und der Haut (ausstülpende U-Naht, Prolene 6-0). Spätestens beim Nähen der Bauchdecke wurde der Narkoseapparat schwächer eingestellt (Flow 2, 50%).

Durch Druck auf die Bauchdecke wurden die Hoden zur Vermeidung von Sekundärkomplikationen (z.B. Verklebungen) in den Hodensack massiert.

Soll die Vasektomie unter keimfreien Bedingungen stattfinden, so wird auf 4.3.3 Vorbereitungen am Operationstag verwiesen.

#### 4.2 Verpaarung, Synchronisation

Spender- und Empfängertiere wurden auf die gleiche Weise verpaart. Der einzige Unterschied bestand darin, die Spendertiere einen Tag früher mit der Trennwand zu verpaaren. Diese Modifikation des Whitten-Effektes hatte sich in der Praxis bewährt. Das Verhältnis ♀:♂ betrug bei beiden 1:3.

Die Weibchen wurden in Gruppen zu 15 Tieren in Makrolonkäfigen Typ III geliefert. Zur Adaptation an die Verhältnisse im Tierraum wurden sie für zwei bis drei Wochen so belassen. Bei einer derartigen Gruppenhaltung wird der normale, 4 - 5-tägige Zyklus unterdrückt.

Durch Zusetzen eines (vasektomierten) Männchens in einem separaten Käfig Typ I (bzw. auf der anderen Seite der Trennwand), wurde der Zyklus synchron aktiviert, da durch die Löcher (10 mm Durchmesser) sowohl eine olfaktorische als auch eine visuelle und z.T. taktile Kontaktaufnahme erfolgen konnte.

Nach dem Entfernen der Trennwand am 3. (bzw. am 4.) Abend um 20.00 Uhr konnten die gedeckten Weibchen am nächsten Morgen um 08.00 anhand des Pfropfes ermittelt werden.

Tabelle 2: Verpaarungsschema

| Tag | Spender                     | Empfänger                 |
|-----|-----------------------------|---------------------------|
| 1   | Verpaaren mit Käfig Typ I   | ---                       |
| 2   | ---                         | Verpaaren mit Trennwand   |
| 3   | ---                         | ---                       |
| 4   | Käfig entfernen 20.00       | Trennwand entfernen 20.00 |
| 5   | Pfropfkontrolle 08.00       | Pfropfkontrolle 08.00     |
| 6   | ---                         | ---                       |
| 7   | E m b r y o t r a n s f e r |                           |

Verpaarungszeit: 12 Stunden.

### 4.3 Embryotransfer

#### 4.3.1 Vorbereitungen

##### 4.3.1.1 Schleusungen

Der Operationsisolator (abwechslungsweise Hysterektomie- oder Hühnerisolator) wurde vor jeder Operation gereinigt und autoklaviert (Tag 1 und 2). Am vierten Tag wurde er mit allen notwendigen Materialien für die Haltung der Tiere und die Operation beschickt (siehe 3.2 "Schleusung"). Dazu waren zwei Zylinder, d.h. 2 Schleusungen nötig.

Nach der Pfropfkontrolle (Tag 5) erfolgte das Umschleusen der 3 - 4 Weibchen. Bei diesem Schleusvorgang wurde Futter, Wasser und Einstreu für einen Monat mitgenommen. Da die Verpaarung gleichzeitig in zwei Isolatoren stattfand, waren auch hier 2 Schleusungen nötig.

##### 4.3.1.2 Instrumente, Geräte und Reagenzien

Lupenlampe und Rasierapparat wurden vor jedem Transfer (Tag 5) am Universitätsspital Zürich mit Äthylenoxid sterilisiert. (4 Stunden, Kaltgas).

Am vierten Tag wurde sämtliches Material für den sterilen Teil des Embryotransfers (4.3.2 Operation) im Zylinder autoklaviert und in den Operationsisolator eingeschleust.

Am Vorabend des Transfers (Tag 6) wurden die Schutzanzüge, Mundschutz, Kopfhauben, Operationsunterlagen, Operationstischchen, Mundstückhalter ebenfalls in einem Zylinder über Nacht autoklaviert. Im verschlossenen Zustand bietet der Zylinder sichere Gewähr für eine sterile Aufbewahrung.

Zum gleichen Zeitpunkt wurden die Instrumente für den keimarmen Schritt des Embryotransfers autoklaviert. (Siehe 3.2 "Entnahme der Eileiter", "Spülung").

#### 4.3.1.3 Vorbereitungen am Operationstag

Am Operationstag erfolgte das Anschleusen des Operationsisolators an den Laminar Flow (Abb. 3), die Herstellung der Spülflüssigkeit sowie das Einrichten der beiden Arbeitsplätze (Spülplatz = möglichst keimarmer Platz, Operationsplatz = steriler Platz).

- Die Sterilisation nach dem Anschleusen erfolgte mit 3%-iger Peressigsäure. Die Einwirkzeit betrug mindestens 40 Minuten.
  
- Die Spülflüssigkeit bestand aus 80 ml PBS, 10 ml FCS und 1 ml L-Glutamin (siehe 3.3 Reagenzien).  
Die drei Flüssigkeiten wurden im Wasserbad auf 30°C erwärmt und unter leichtem Schwenken miteinander vermengt. Obwohl sämtliche Zutaten steril waren, wurde die Spülflüssigkeit ihrerseits in eine 20 ml Spritze aufgesogen und dann mit einem Filter-Spritzenaufsatz (Acrodisc® 0,45 µm) direkt beim Gebrauch nochmals sterilfiltriert.
  
- Einrichten des Spülplatzes:  
Vorgängig wurde der Tisch gereinigt und zweimal mit Beloran® desinfiziert.
  
- Einrichten des Operationsplatzes:  
Für die weiteren Einrichtungsarbeiten war absolute Sterilität unerlässlich. Deshalb wurden zu diesem Zeitpunkt Kopfhaut, Mundschutz, Schutzanzug und Handschuhe angelegt.

Die Operationsunterlagen wurden aus dem Zylinder entnommen und in den Laminar Flow gestellt. Sie bildeten die sterile Arbeitsfläche. Die Lupenlampe wurde seitlich von den Unterlagen installiert.

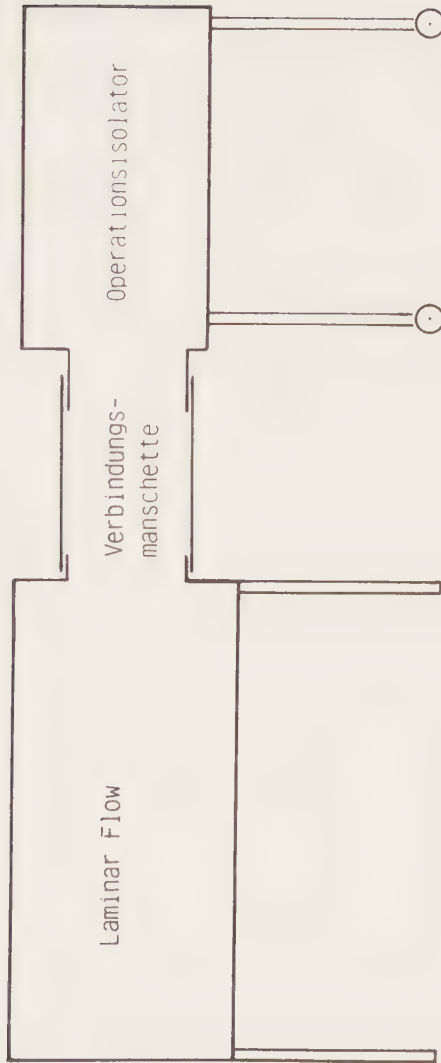


Abb. 3: Versuchsanordnung

Eine Hilfsperson öffnete anschliessend den Isolator und gab die benötigten Instrumente\*) heraus. Ebenfalls reichte die Hilfsperson die Klingen, Spritzen, Nadeln und den Rasierapparat in halbgeöffneter Form dar.

Der fertig installierte Arbeitsplatz präsentierte sich gemäss Abb. 4.

Unmittelbar anschliessend wurde das erste Empfängertier aus dem Isolator gereicht.

---

\*) Der Filter der Narkosemaske wurde vor dem Gebrauch aufgeschraubt und kontrolliert. Ein allfällig defektes Filterpapier (bedingt durch das Autoklavieren) wurde ersetzt. Die Narkosemaske wurde anschliessend auf dem Operationstischchen mit den dafür vorgesehenen Klammern fixiert.

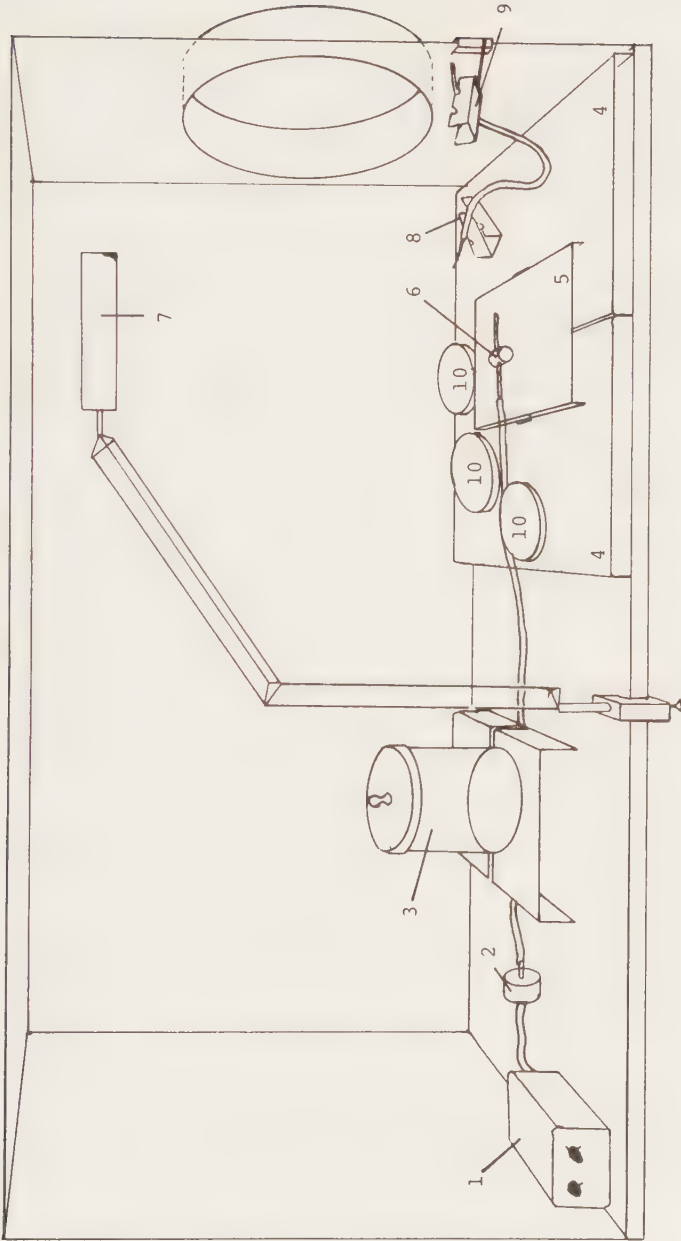


Abb. 4: Versuchsanordnung im Laminar Flow

1 = Narkosegerät  
2 = Filtergerät  
3 = Aethertopf

4 = Operationsunterlagen  
5 = Operationstischchen  
6 = Narkosemaske

7 = Lupenlampe  
8 = Pipettenhalter  
9 = Mundstückhalter  
10 = Petrischalen mit Instrumenten

#### 4.3.2 Operation

Der ET gliederte sich in zwei Arbeitsgänge:

- Die Gewinnung der Embryonen unter möglichst keimarmen Bedingungen (Entnahme der Eileiter, Spülung).
- Die Uebertragung der Embryonen unter strikt sterilen Bedingungen (Operation).

##### 4.3.2.1 Entnahme der Eileiter

2 Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und für 30 Sekunden in 10%-ige Formalin-Lösung getaucht. Nach kurzem Abtrocknen mit Zellstoff wurden die Tiere nebeneinander auf einer Korkplatte aufgenadelt.

Mit dem angegebenen Besteck war es möglich, für jede neue "Schicht" ein neues Instrument zu wählen. Im einzelnen wurde:

- Die Haut mit 1 Pinzette, 1 Metzenbaumschere, 1 Skalpell freipräpariert,
- die Bauchhöhle mit 1 Pinzette, 1 Metzenbaumschere eröffnet, und die Därme leicht zur Seite geschoben,
- das Uterushorn mit der feinen Pinzette gefasst, und mit der spitzen Schere vom Mesometrium freipräpariert.
- der Uterus kranial zwischen Ovar und Eileiter (d.h. der Eileiter haftet am Uterus an), kaudal in der Mitte des Uterushornes abgetrennt.

Die Eileiter wurden in ein Gewebekulturschälchen mit sterilfiltrierter Spülflüssigkeit gelegt. Eventuell anhaftendes Blut oder Fett konnte durch Schwenken der Proben weggespült werden.

Um später unter dem Stereomikroskop arbeiten zu können, wurde jedes Eileiterstück einzeln in einen Tropfen Spülflüssigkeit im Deckel einer Gewebekulturschale umgebettet.

#### 4.3.2.2 Spülung

Die Spülung wurde unter dem Stereomikroskop bei einer 15- bis 20-fachen Vergrösserung und bei Auflicht vorgenommen. Um die hellen Eileiter besser abgrenzen zu können, erfolgte dieser Arbeitsschritt auf einer schwarzen Unterlage aus Schweisserglas.

Die Eileiter wurden so gedreht, dass die Ampulle mit ihrer Oeffnung gegen rechts zu liegen kam. Mit der Pinzette JFLP-3 wurde die Ampulle mit der linken Hand gehalten, während mit der rechten Hand eine Spritze (Luer-Lock) mit einer stumpfen Nadel (Hamilton) in die Ampulle und einen Teil des Eileiters eingeführt wurde. Während die rechte Hand sich möglichst ruhig verhielt, wechselte die linke Hand die Pinzette. Mit der geraden Pinzette JF-5 wurde der Eileiter und die Nadel festgeklemmt.

Durch kontinuierliche, langsame Druckerhöhung floss Spülflüssigkeit durch Eileiter und Uterus in die Gewebeschale. Der ganze Vorgang nahm für einen Eileiter ca. 1 Minute in Anspruch. Die Spülmenge betrug ca. 0,5 ml.

Die Gewebeschälchen wurden bei schwachem Durchlicht und bei einer 50-fachen Vergrösserung nach Embryonen abgesucht.

Diese wurden mit einer Pipette aufgesogen und in einen Objektträger mit einer Vertiefung gegeben.

Die Embryonen wurden mikroskopisch auf Schäden untersucht (siehe 4.4). Einwandfreie Embryonen im 8-Zell-Stadium wurden noch zweimal in sterile Spülflüssigkeit umgebettet, in der letzten Vertiefung in zwei gleich grosse Häufchen aufgeteilt, und das Mikroskop so eingestellt, dass beide Häufchen gut sichtbar waren.

Zu diesem Zeitpunkt wurden die Schutzkleider gewechselt, d.h. neue sterile Kopfhaut, Schutzanzug und Handschuhe angezogen.

#### 4.3.2.3 Narkose der Empfängertiere

Die Maus wurde in den Äthertopf gesetzt. Nach ca. 2 Minuten und 30 Sekunden war die Narkose tief genug. Der Rücken wurde grossflächig rasiert, und die noch anhaftenden Haare mit Wasser und einem Gazetupfer entfernt.

Danach wurde die Maus in Bauchlage fixiert und der Kopf in die Narkosemaske gesteckt. (Maximalleistung 100%, Flow 4.)

Bis zur Erreichung des Toleranzstadiums blieb Zeit, die Embryonen in zwei Pipetten aufzusaugen. Dazu öffnete die Hilfsperson die Deckel für Gaze, Pipetten und Mundstückschlauch. Die Gaze diente als steriler Handschutz auf der Mikroskopunterlage. Die Hand konnte sich darauf abstützen. Anschliessend wurde jeweils ein Häufchen der Embryonen in eine Pipette aufgesogen.

(Die Pipetten wurden vor dem Aufsaugen zweimal mit Spülflüssigkeit gespült, um evtl. anhaftende Salzurückstände vom Autoklavieren zu entfernen.)

Im Laminar Flow wurden die Pipetten im Pipettenhalter, das Mundstück des Verbindungsschlauches im Mundstückhalter festgeklemmt.

#### 4.3.2.4 Operation der Empfängertiere

Die Rückenhaut wurde median von der Mitte des Thorax bis in den Lendenbereich eröffnet. (Schnittlänge ca. 2,5 cm.) Mit der Pinzette wurde die Haut seitlich stumpf freipräpariert.

Durch die Flanke schimmert das Fett des Ovars deutlich durch. Hier oder leicht kranial davon (unter Schonung der Blutgefässe) wurde die Flanke eröffnet, und Uterus sowie Ovar am Fett herausgezogen und festgehalten.

Eine Tuberkulinspritze mit einer 26G Nadel wurde kurz in Methylenblau 0,5% getaucht und unter der Lupenlampe ca. 3 mm kaudal

des Ueberganges Uterus / Eileiter ins Uteruslumen gestochen. (Winkel: ca.  $45^{\circ}$  Richtung Zervix). Das Methylenblau hinterliess einen feinen Punkt.

Durch dieses markierte Loch konnte die Pipette in das Uteruslumen eingeführt werden.

Die Embryonen wurden mit möglichst wenig Spülflüssigkeit ins Uteruslumen ausgeblasen.

Uterus und Ovar wurden am Fett wieder in die Bauchhöhle reponiert, die Flanke mit einer Sultan'schen Diagonalnaht (Vicryl 5-0) verschlossen.

Mit der zweiten Seite wurde genauso verfahren.

Die Haut wurde mit Prolene 6-0 mit einer Kammnaht (U-Naht) verschlossen.

Die Hilfsperson hielt vom Isolator her einen mit Zellstoff ausgelegten Käfig entgegen. Darin wurde die Maus in Seitenlage in den Operationsisolator zurückgenommen.

Anschliessend wurde die nächste Maus mit einem neuen Besteck operiert.

Sobald die Tiere aus der Narkose erwachten, wurde eine Wasserflasche gesteckt und einige Futterwürfel auf den Käfigboden gelegt. Später wurden die Käfige eingestreut und die Raufe mit Futter gefüllt.

#### 4.4 Embryonen

##### 4.4.1 Mikroskopische Beurteilung

Die lichtmikroskopische Beurteilung erfolgte unmittelbar nach dem Spülen der Eileiter. Dazu wurde das Stereomikroskop (Wild und Leitz M8) auf die maximale Vergrößerung (50-fach) und auf Durchlicht gestellt.

In Anlehnung an AVERILL [1] wurden folgende Parameter beurteilt:

- Sphaerische Form und Intaktheit der Zona pellucida
- Entwicklungsstand der Embryonen (d.h. entsprach der Entwicklungsstand dem für den betreffenden Tag typischen Stadium; 8-Zell-Stadium am 3. Tag)
- Regelmässigkeit und sphaerische Form der Blastomeren
- Symmetrie der Blastomeren
- Intaktheit und Abgegrenztheit der Blastomeren untereinander.

Es gelangten nur morphologisch einwandfreie Embryonen zur Uebertragung.

##### 4.4.2 Vitalfärbung

In Anlehnung an die durch NIEMANN [61] erwähnte Methode wurde bei einer beschränkten Anzahl von Embryonen eine Vitalfärbung mit FDA (3'6'-Fluorescein-Diacetyl, Serva-Nr. 21'575) versucht. MOHR et al. [58] hatten diesen Farbstoff an Mäuseembryonen erprobt und für geeignet befunden.

Bei FDA ( $C_{20}H_{10}O_5 \cdot (C_2H_3O)_2$ ) handelt es sich um eine Esterverbindung, die erst nach hydrolytischer Spaltung fluoresziert.

Dieser Vorgang setzt eine aktive Stoffwechselleistung von Enzymen (Esterasen) einer lebenden Zelle voraus [61]. ROTMAN et al. [64] wiesen nach, dass die Esterverbindung frei durch die Membranen diffundieren kann. Das abgespaltene Fluorescein dagegen ist polar und sammelt sich innerhalb der Zellen an. Mit FDA kann somit die metabolische Leistungsfähigkeit einer Zelle und die Intaktheit ihrer Membranen überprüft werden.

Vitale Embryonen leuchten hellgrün auf, abgestorbene heben sich vom Untergrund kaum ab.

FDA ist nicht zelltoxisch und eignet sich deshalb für die Vitaldiagnostik [58,61].

Methode: (Angaben nach NIEMANN [61])

Nach dem Erstellen einer Stammlösung von 1 mg FDA / 1 ml Aceton wurden jeweils 5 µl dieser Lösung zu 2 ml Kulturmedium (PBS) zugegeben (Konzentration = 1: 400'000, pH 7,4). In dieser Lösung wurden die Embryonen während 3 - 5 Minuten inkubiert. Um störende Hintergrundfluoreszenz auszuschalten, wurden die Embryonen in frisches Medium (PBS) überführt und anschliessend unter dem Fluoreszenzmikroskop (Wild und Leitz Laborlux 11) bei 100-facher Vergrösserung beurteilt.

## 4.5 Kontrollen

### 4.5.1 Mikrobiologische Kontrolle

In den Züchtungs- und Verpaarungsisolatoren unterlagen die Tiere einer drei- bis vierwöchigen Kontrolle. Dabei richtete man sich nach den notwendigen Schleusungen für Futter, Wasser und Einstreu.

Operierte Tiere wurden zweimal untersucht, eine bzw. zwei Wochen nach der Operation. Danach erfolgte das Umschleusen in einen weiteren Isolator, in dem wieder der normale drei bis vierwöchige Kontrollrhythmus aufgenommen wurde.

#### Kotproben

Die mikrobiologische Sterilitätskontrolle erfolgte in den meisten Fällen mittels Kotproben. Dazu wurden die Kotballen möglichst frisch ( $O_2$ -Empfindlichkeit mancher Darmbakterien) in Schraubdeckelflaschen abgefüllt. Futterreste durften beige-mischt sein, jedoch keine Einstreu, da die Gerbsäure aus der Einstreu hemmend auf das Bakterienwachstum wirkt.

Die Proben wurden in 20 ml Thioglykolat aufgeschüttelt und während 24 bis 48 Stunden bei 37°C bebrütet. Die Medien wurden auf Trübung, Gasbildung und Flocken beurteilt, danach geschüttelt und je 0,8 ml in 4 Röhrchen überimpft, wovon 2 Thioglykolat, eines Trypticase-Soja-Bouillon und eines Mycophil-Broth enthielten.

Ein Thioglykolat-Röhrchen wurde bei 55°C und das Mycophil-Broth-Röhrchen bei 26°C bebrütet, die beiden anderen bei 37°C. Zu diesem Zeitpunkt wurde ausserdem jede Probe auf zwei Blutplatten überimpft, wovon eine aerob, die andere anaerob bei 37°C bebrütet wurde. Auf die Blutplatten wurden ca. 0,15 ml Suspension (mit kleinen Kotpartikeln) gebracht und mit einem Spatel oder einer Oese ausgestrichen, da nach unserer Beobachtung sehr empfindliche Anaerobier oftmals nur in unmittelbarer Nähe von Kotteilchen wuchsen.

## Ganzkörper-Kontrolle

In den Züchtungsisolatoren fielen Tiere an, die nicht weiter benötigt wurden. Diese Tiere wurden in einigen Fällen dem weniger üblichen Verfahren der Ganzkörper-Kontrolle unterzogen. Dabei wurde das Tier in einem Einmachglas entnommen und mit CO<sub>2</sub> euthanasiert. Anschliessend wurden Proben von der Körperoberfläche (Nasenspiegel, Unterlippe, Zunge, Anus), der Lunge (4x) und vom Darm (4x) entnommen und in je 2 Thioglykolat-, einem TSB- (Trypticase-Soja-Bouillon) und einem Mycophil-Broth-Röhrchen bebrütet.

Auch hier wurde jeweils ein Thioglykolat-Röhrchen bei 55°C und das Mycophil-Röhrchen bei 26°C bebrütet, die anderen bei 37°C. Die Kontrolle auf Bakterienwachstum erfolgte nach 24 und nach 48 Stunden. Verdächtige Proben wurden auf Blutagar umgezüchtet.

Besondere Aufmerksamkeit wurde dem Caecum geschenkt, welches bei keimfreien Tieren um das 4 - 6-fache vergrössert ist, nach einer bakteriellen Besiedlung des Darmes jedoch wieder zur normalen Grösse schrumpft [41,50,51].

Für die im weiteren Verlauf nötig gewordenen Untersuchungen wurden die gleichen Organe, zusätzlich jedoch noch Leber, Milz, Niere, Herz und Uterus verwendet. Dabei wurde vorwiegend mit Thioglykolat mit einem Zusatz von 10% FCS und der Kochblutplatte gearbeitet. Die Bebrütung fand im Anaerobiertopf (Zeisslertopf) bei 37°C statt.

### 4.5.2 Genetische Kontrolle

Die Kontrolle beschränkte sich auf das Äussere der Jungen. Deshalb wurden Spendertiere verwendet, die sich in der Fellfarbe von den albinotischen Empfängertieren unterschieden. Schwarze, bzw. graue Junge konnten leicht den Stämmen C57BL/6J, bzw. DBA/2J zugeordnet werden.

Die Embryonen des ebenfalls albinotischen Stammes BALB/cByJ wurden erst gegen Ende der Versuchszeit transferiert. Hier erfolgte keine Kontrolle mehr, da in der Zwischenzeit die Sterilität der vasktomierten Männchen mehrfach bewiesen war.

#### 4.5.3 Jungtiere, Aufzucht

Nach der Operation liess man die Tiere möglichst ungestört. Das Wechseln (d.h. das Umsetzen der Tiere in Käfige mit frischer Einstreu) erfolgte einmal wöchentlich. Dabei konnte einerseits der Heilungsverlauf, andererseits aber auch die Entwicklung der Trächtigkeit (Vergrösserung des Bauchumfanges) verfolgt werden.

Zwei Tage vor dem voraussichtlichen Wurfdatum wurde ein letztes Mal umgesetzt.

Jeweils morgens und abends wurde überprüft, ob die Tiere schon geworfen hatten. Die Jungen wurden gezählt. Die Ueberprüfung des Entwicklungsverlaufs der Jungen erfolgte einmal wöchentlich beim Wechseln der Käfige.

Mit 4 - 5 Wochen wurden die Jungen abgesetzt, bzw. wurde die Mutter aus dem Käfig der Jungen entfernt. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Geschlechtsbestimmung der Jungtiere.

#### 4.5.4 Zuchtpaare, Nachzucht

Die Zuchtpaarbildung erfolgte aus den Jungtieren eines Wurfes, wobei eine Verpaarung 1:1 gewählt wurde. Ueberzählige Tiere standen der mikrobiologischen Kontrolle (Ganzkörper-Kontrolle) zur Verfügung.

Die Zuchtpaare wurden im Alter von 6 Wochen ohne vorherige Be-

siedlung mit einer Darmflora (z.B. CRF-Flora\*) in die SPF-Anlage eingeschleust. Die Haltung entsprach derjenigen der übrigen Tiere. Die Würfe wurden registriert. Eine Zuchtlinie galt nach spätestens drei Würfen als etabliert.

#### 4.6 Hysterektomie

Bei der Hysterektomie wird der Uterus mitsamt den geburtsreifen Feten entnommen und durch eine Schleuse mit Desinfektionsmittel (i.d.R. Tauchbad) in einen keimfreien Isolator transferiert. Dort werden die Feten aus dem Uterus entnommen, trockengerieben und nach einer Vitalitätskontrolle einer Ammenmutter unterlegt [3,5].

An der Abteilung für Labortierkunde wurde dieses Verfahren folgendermassen durchgeführt:

- Das Spendertier wurde durch zervikale Dislokation getötet, kurz in eine Lösung mit Beloran® getaucht und dann auf einer Korkplatte aufgenadelt.
- Mit sterilem Besteck wurde der Uterus freipräpariert und die Zervix mit einer Klemme gefasst.
- Der Uterus wurde kaudal der Klemme von der Zervix und entlang des Uterus vom Mesometrium abgesetzt.

---

\*) Colonization Resistance Factor [46]

Mäuse mit einer bestimmten Flora (Laktobazillen, Bifidobakterien) sind vor einer Besiedlung des Darmes mit E. coli geschützt [41,49,50].

- Während 10 Sekunden wurde der gesamte Uterus in eine 37°C warme, 10%-ige Formalin-Lösung getaucht, dann via
- Tauchbad (Beloran<sup>®</sup> 5%) in den Isolator eingeschleust.
- Innerhalb des Isolators wurden die Jungen aus dem Uterus entnommen, mit einem feuchten Gazetupfer gereinigt und durch Massage des Brustkorbes zur Atmung angeregt.
- Sobald die Jungen eine rosarote Farbe aufwiesen, wurden sie im Sägemehl der vorgesehenen Amme kurz gewendet, dann der Amme unterlegt. Als Ammentiere wurden solche des Stammes Zur:ICR (wie ET) verwendet.

Plazenten, Eihäute, Uterus und tote Junge wurden zur mikrobiologischen Kontrolle in Schraubdeckelflaschen abgefüllt und aus dem Isolator entnommen. Die Proben wurden mit Thioglykolat, bzw. mit TSB (Trypticase-Soya-Bouillon) angesetzt und bei 37°C bebrütet.

## 5. Resultate

### 5.1 Vasektomie

Bezüglich Operationstechnik und Heilungsverlauf bietet die Methode keine Schwierigkeiten.

In einem Vorversuch mit 8 Tieren blieb die Deckbereitschaft nach Vasektomie bei allen 8 Männchen erhalten. Beim Hauptversuch im Isolator, in dem nicht beliebig viele Weibchen zur Verfügung standen, wurden 2 von 8 Männchen nach 3 vergeblichen Deckversuchen (Verpaarungszeit 12 Stunden) entfernt. Wie aus Tabelle 6 ersichtlich ist, standen nach den ersten drei Verpaarungen jeweils weniger als 18 Weibchen zur Verfügung, so dass sechs Männchen bei einem Verpaarungsverhältnis von 1 : 3 genügten.

Die Sektion der beiden ausgeschiedenen Tiere ergab keine Veränderungen, die eine verminderte Libido verursacht hätten. Die Hoden waren gross und die Samenleiter gut abgeheilt. Ob das Nicht-Decken mit besonderen Verhältnissen im Isolator zusammenhängt, bliebe weiter abzuklären.

Im Vorversuch trat bei einer Maus eine Verklebung auf. Dabei waren die Fettanhängsel der beiden Samenstränge (funiculi spermatici) untereinander verklebt. Pfröpfe wurden jedoch gleich häufig wie bei den andern sieben Männchen gefunden.

Die Sektion der verbliebenen Männchen erfolgte 10 Wochen nach Versuchsende, bzw. 35 Wochen nach der Vasektomie. Alle Tiere zeigten eine Hodenatrophie. Die Grösse war um ca. 30% vermindert, das Gewebe fühlte sich weich an.

## 5.2 Verpaarung, Synchronisation

Die Tabellen 3 - 6 zeigen den notwendigen Aufwand, um an einem bestimmten Tag genügend Spender- und Empfängertiere zur Verfügung zu haben.

Tabelle 3: C57BL/6

| Verpaarte<br>Tiere | Tiere mit Pfropf |      |
|--------------------|------------------|------|
|                    | absolut          | %    |
| 30                 | 6                | 20,0 |
| 45                 | 12               | 26,7 |
| 45                 | 5                | 11,1 |
| 30                 | 5                | 16,7 |
| 150                | 28               | 18,7 |

Sterilität: 8%  
korrigierter Wert

20,3 %

Tabelle 4: DBA/2J

| Verpaarte<br>Tiere | Tiere mit Pfropf |      |
|--------------------|------------------|------|
|                    | absolut          | %    |
| 15                 | 4                | 26,7 |
| 48                 | 10               | 20,8 |
| 39                 | 10               | 25,6 |
| 43                 | 9                | 20,9 |
| 34                 | 9                | 26,5 |
| 179                | 42               | 23,5 |

Sterilität: 31%  
korrigierter Wert

34,0 %

Tabelle 5: BALB/c

| Verpaarte<br>Tiere | Tiere mit Pfropf |      |
|--------------------|------------------|------|
|                    | absolut          | %    |
| 45                 | 11               | 24,4 |
| 45                 | 11               | 24,4 |
| 42                 | 10               | 23,8 |
| 44                 | 12               | 27,3 |
| 48                 | 13               | 27,1 |
| 224                | 57               | 25,4 |

Sterilität: 32%  
korrigierter Wert

37,4 %

Tabelle 6: Zur:ICR

| Verpaarte<br>Tiere | Tiere mit Pfropf |      |
|--------------------|------------------|------|
|                    | absolut          | %    |
| 10                 | 3                | 30,0 |
| 17                 | 5                | 29,4 |
| 19                 | 3                | 15,8 |
| 18                 | 5                | 27,8 |
| 17                 | 3                | 17,6 |
| 10                 | 2                | 20,0 |
| 11                 | 2                | 18,2 |
| 7                  | 5                | 71,4 |
| 10                 | 7                | 70,0 |
| 9                  | 2                | 22,2 |
| 10                 | 3                | 30,0 |
| 12                 | 4                | 33,3 |
| 12                 | 4                | 33,3 |
| 162                | 48               | 29,6 |

Die erhobenen Werte unterscheiden sich von den von WHITTEN [81] übermittelten Zahlen zum Teil beachtlich. Sie schwanken zwischen 18,7 - 29,6%, und befinden sich damit nur leicht oberhalb des Mittelwertes von 17 - 25%, der bei einer Zyklusdauer von 4 - 6 Tagen zu erwarten ist.

Hierfür sind zwei Gründe mitverantwortlich: Zum einen betrug die Verpaarungsdauer strikt 12 Stunden, wogegen die von WHITTEN ermittelten Zahlen aus Versuchen mit Dauerverpaarung und täglicher Pfropfkontrolle stammten.

Zum anderen handelt es sich bei den Spendertieren um Inzucht-tiere. FESTING [23] gibt für die verwendeten Stämme Sterilitäten von 8 - 32% an (Tabellen 3 - 5). Darunter sind z.B. Scheidenspangen / -septen zu verstehen, die eine Kopulation verunmöglichen [81]. Korrigiert man die erhobenen Werte um diesen Sterilitätsfaktor, ergeben sich Zahlen von 20,3 - 37,4%, so dass sich der Whitten-Effekt doch bemerkbar macht.

Des weiteren stellte sich heraus, dass rund ein Fünftel aller Pfropf-positiven Tiere unbefruchtete Eizellen aufwies. Die stammesspezifischen Unterschiede waren sehr gering. Die Tabellen 7 - 9 geben die Einzelresultate wieder.

Tabelle 7: C57BL/6J

| Transfer-<br>Nummer | Gespülte<br>Tiere | Tiere mit<br>befruchteten<br>Eizellen | Tiere mit un-<br>befruchteten<br>Eizellen | Gewonnene*)<br>Embryonen<br>(8-Zell-St) |
|---------------------|-------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1                   | 2                 | 1                                     | 1                                         | 8                                       |
| 2                   | 2                 | 2                                     | -                                         | 17                                      |
| 3                   | 3                 | 3                                     | -                                         | 17                                      |
| 4                   | 2                 | 2                                     | -                                         | 16                                      |
| 5                   | 3                 | 2                                     | 1                                         | 13                                      |
| 6                   | 3                 | 2                                     | 1                                         | 15                                      |
| 7                   | 3                 | 2                                     | 1                                         | 12                                      |
| 8                   | 2                 | 2                                     | -                                         | 11                                      |
| 9                   | 3                 | 2                                     | 1                                         | 13                                      |
| 10                  | 2                 | 2                                     | -                                         | 13                                      |
|                     | 25                | 20 80%                                | 5 20%                                     | 135                                     |

Tabelle 8: DBA/2J

|    |    |          |         |     |
|----|----|----------|---------|-----|
| 11 | 3  | 2        | 1       | 16  |
| 12 | 2  | 2        | -       | 14  |
| 13 | 3  | 2        | 1       | 16  |
| 14 | 3  | 2        | 1       | 20  |
| 15 | 3  | 2        | 1       | 19  |
| 16 | 3  | 2        | 1       | 18  |
| 17 | 3  | 2        | 1       | 20  |
| 18 | 2  | 2        | -       | 20  |
| 19 | 3  | 1        | 2       | 12  |
| 20 | 2  | 2        | -       | 20  |
| 21 | 2  | 2        | -       | 18  |
| 22 | 2  | 2        | -       | 21  |
|    | 31 | 23 74,2% | 8 25,8% | 214 |

Tabelle 9: BALB/cByJ

| Transfer-<br>Nummer | Gespülte<br>Tiere | Tiere mit<br>befruchteten<br>Eizellen | Tiere mit un-<br>befruchteten<br>Eizellen | Gewonnene*)<br>Embryonen<br>(8-Zell-St) |
|---------------------|-------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 25                  | 2                 | 2                                     | -                                         | 13                                      |
| 26                  | 3                 | 2                                     | 1                                         | 13                                      |
| 28                  | 2                 | 2                                     | -                                         | 14                                      |
| 29                  | 2                 | 2                                     | -                                         | 13                                      |
| 30                  | 2                 | 2                                     | -                                         | 16                                      |
| 31                  | 2                 | 2                                     | -                                         | 16                                      |
| 32                  | 3                 | 2                                     | 1                                         | 10                                      |
| 33                  | 3                 | 2                                     | 1                                         | 10                                      |
| 34                  | 4                 | 2                                     | 2                                         | 12                                      |
| 35                  | 2                 | 2                                     | -                                         | 15                                      |
|                     | 25                | 20    80%                             | 5        20%                              | 132                                     |

\*) Bei Tieren mit befruchteten Eizellen waren durchschnittlich 3/4 aller Embryonen im 8-Zell-Stadium. Bei den in dieser Kolonne angegebenen Embryonen handelt es sich um die gleichen, die später übertragen wurden. Sie entsprachen den morphologischen Parametern von Kapitel 4.4.1.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchung konnte nicht geklärt werden, ob beim Auszuchtstamm Zur:ICR die Zahl der irrtümlicherweise Pfropf-positiven Tiere gleich hoch wie bei Inzucht-tieren (Spendertiere) ist. Immerhin wurden 27 von 32 operierten Tieren gravid (84,4%) und gebaren mindestens 1 Junges (Tabelle 10).

Tabelle 10: Empfängertiere

|                        |      |
|------------------------|------|
| Operierte Tiere        | : 32 |
| gestorben postoperativ | : 2  |
| Gravide Tiere          | : 27 |
| keine Jungen           | : 3  |

### 5.3 Embryotransfer

Es wurden insgesamt 32 Transfers ausgeführt, die sich wie folgt auf die drei Stämme verteilen:

- C57BL/6J/Zur 10 ( 1 - 10)
- DBA/2J/Zur 12 (11 - 22)
- BALB/cByJ/Zur 10 (25-26,28-35)

Die Resultate sind in den Tabellen 11 - 13 zusammengefasst.

Tabelle 11: C57BL/6

| Transfer-<br>Nummer | Übertragene<br>Embryonen | Geborene  |             | Ver-<br>hält-<br>nis<br>m : w | Verluste*     |           |
|---------------------|--------------------------|-----------|-------------|-------------------------------|---------------|-----------|
|                     |                          | Junge     | %           |                               | Auf-<br>zucht | Rest      |
| 1                   | 8 ( 8 - )                | 4         | 50,0        | 2: 1                          | 1             | 1 m       |
| 2                   | 17 ( 8 9)                | 7         | 41,2        | 4: 2                          | 1             | 2 m       |
| 3                   | 17 ( 8 9)                | 0         | 0,0         | -                             | -             | -         |
| 4                   | 16 ( 7 9)                | 3         | 18,8        | 2: 1                          | -             | 1 m       |
| 5                   | 13 ( 6 7)                | 1         | 7,7         | ?                             | 1             | -         |
| 6                   | 15 ( 10 5)               | 3         | 20,0        | 1: 0                          | 2             | 1 m       |
| 7                   | 10 ( 5 5)                | 4         | 40,0        | 1: 2                          | 1             | 1 w       |
| 8                   | 11 ( 6 5)                | 3         | 27,3        | 3: 0                          | -             | 3 m       |
| 9                   | 13 ( 8 5)                | 2         | 15,4        | 2: 0                          | -             | 2 m       |
| 10                  | 13 ( 8 5)                | 6         | 46,2        | 2: 4                          | -             | 2 w       |
| <b>Total</b>        | <b>133</b>               | <b>33</b> | <b>24,8</b> | <b>17:10</b>                  | <b>6</b>      | <b>13</b> |

(... ..) = Übertragung in das (linke Horn | rechte Horn)

\* Die Verluste sind unter Punkt 5.5.3 Jungtiere, Aufzucht genauer aufgeschlüsselt.

In den Tabellen 11 - 13 setzen sich die Aufzuchtverluste aus spontanen, i.d.R. perinatalen Todesfällen zusammen. Die letzte Kolonne gibt die Verluste an, die durch ein unglückliches Geschlechtsverhältnis von Männchen (m); Weibchen (w) zustande kamen (strikte Bruder-Schwesterpaarung).

Tabelle 12: DBA/2J

| Transfer-<br>Nummer | Uebertragene<br>Embryonen | Geborene |      | m : w | Verluste      |      |
|---------------------|---------------------------|----------|------|-------|---------------|------|
|                     |                           | Junge    | %    |       | Auf-<br>zucht | Rest |
| 11                  | 16 ( 8/ 8)                | 3        | 18,8 | -     | 3             | -    |
| 12                  | 5 ( 5/ -)                 | 0        | 0,0  | -     | -             | -    |
| 13                  | 16 ( 8/ 8)                | 3        | 18,8 | 1: 1  | -             | -    |
| 14                  | 20 ( 9/11)                | 1        | 5,0  | -     | 1             | -    |
| 15                  | 18 ( 9/10)                | 3        | 15,8 | 2: 1  | -             | 1 m  |
| 16                  | 18 ( 8/10)                | 4        | 22,2 | 2: 2  | -             | -    |
| 17                  | 20 (10/10)                | 3        | 15,0 | 1: 2  | -             | 1 w  |
| 18                  | 11 (11/ -)                | 0        | 0,0  | -     | -             | -    |
| 19                  | 12 ( 7/ 5)                | 1        | 8,3  | -     | 1             | -    |
| 20                  | 20 (10/10)                | 6        | 30,0 | 4: 2  | -             | 2 m  |
| 21                  | 18 (10/ 8)                | 2        | 11,1 | -     | 2             | -    |
| 22                  | 21 (10/11)                | 5        | 23,8 | 0: 5  | -             | 5 w  |
| Total               | 196                       | 31       | 15,8 | 10:13 | 8             | 9    |

Tabelle 13: BALB/cByJ

| Transfer-<br>Nummer | Uebertragene<br>Embryonen | Geborene  |      | m : w | Verluste      |      |
|---------------------|---------------------------|-----------|------|-------|---------------|------|
|                     |                           | Junge     | %    |       | Auf-<br>zucht | Rest |
| 25                  | 13 ( 6/ 7)                | 7         | 53,8 | 2: 5  | -             | 3 w  |
| 26                  | 13 ( 7/ 6)                | 3         | 23,1 | 1: 2  | -             | 1 w  |
| 28                  | 14 ( 7/ 7)                | 4         | 28,6 | 1: 2  | 1             | 1 w  |
| 29                  | 13 ( 6/ 7)                | 3         | 23,1 | 2: 1  | -             | 1 m  |
| 30                  | 16 ( 7/ 9)                | 7         | 43,8 | 2: 4  | 1             | 2 w  |
| 31                  | 16 ( 8/ 8)                | gestorben |      |       |               |      |
| 32                  | 10 ( 5/ 5)                | 3         | 30,0 | 0: 3  | -             | 3 w  |
| 33                  | 10 ( 5/ 5)                | gestorben |      |       |               |      |
| 34                  | 12 ( 7/ 5)                | 1         | 8,3  | -     | 1             | -    |
| 35                  | 15 ( 7/ 8)                | 10        | 66,7 | 6: 4  | -             | 2 m  |
| Total               | 106*) (132)               | 38        | 35,8 | 14:21 | 3             | 13   |

\*) Ohne (mit) Transfer Nummer 31 und 33.

Abb. 5

Graphische Darstellung der

-  übertragenen Embryonen
-  geborenen Jungen
-  abgesetzten Jungtiere

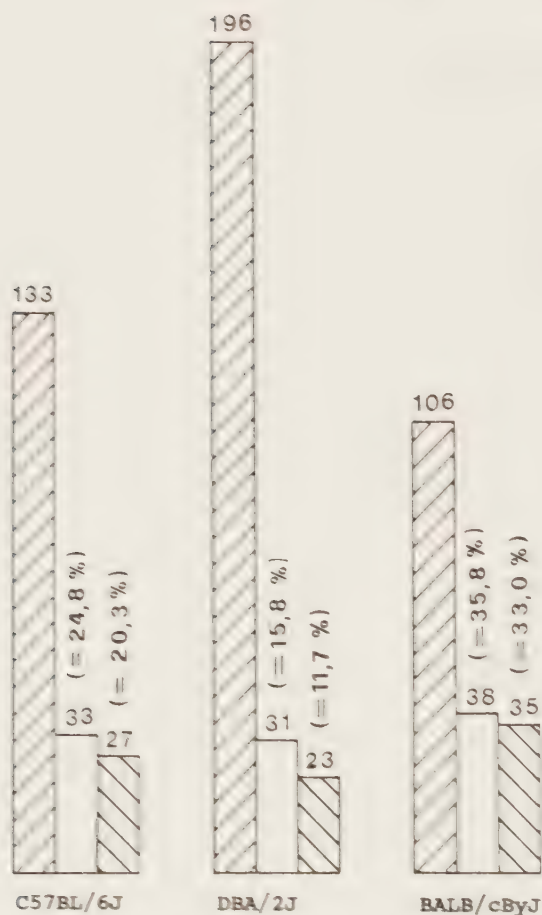


Abbildung 5 zeigt die Anzahl der übertragenen Embryonen und der geborenen Jungen bzw. der abgesetzten Jungtiere. Bei der Gegenüberstellung der drei Stämme unterschieden sich DBA/2J und BALB/cByJ hochsignifikant ( $p < 0.01$ ).

Die Unterschiede zwischen den anderen Stämmen lagen zwar im Bereich von 10%, liessen sich jedoch im  $\chi^2$ -Test nicht absichern. Dazu war das Zahlenmaterial zu gering.

Tabelle 14: Anzahl der geborenen Jungen bezogen auf die Anzahl der transferierten Embryonen.

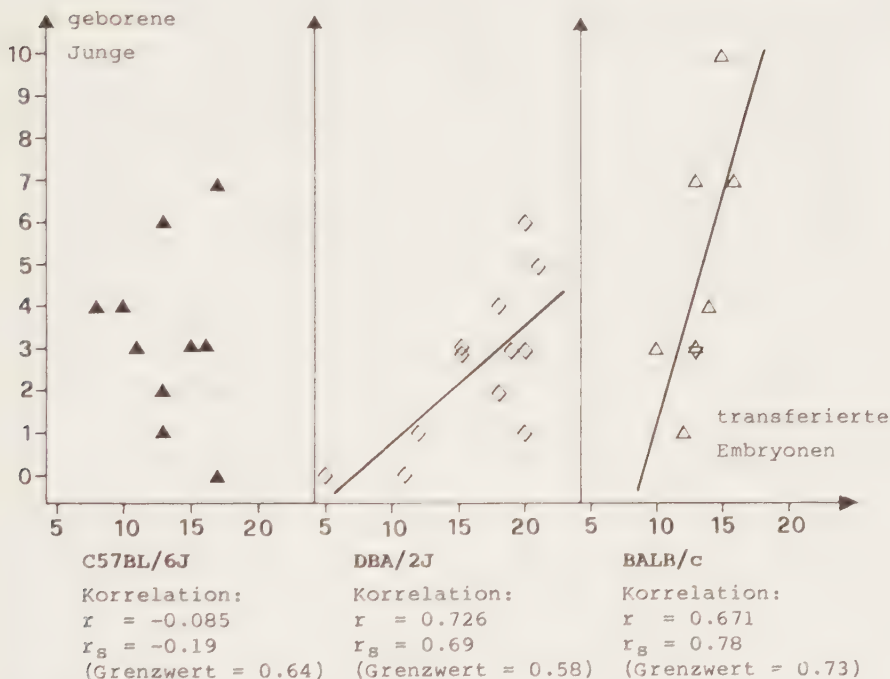


Tabelle 14 zeigt das Verhältnis von geborenen Jungen zu übertragenen Embryonen. Die Abhängigkeiten wurden mittels Korrelationskoeffizienten ( $r$ ), bzw. Rangkorrelationskoeffizienten ( $r_s$ ) berechnet. Während sich für den Stamm C57BL/6J keine Korrelation errechnen liess, ergaben sich für die beiden anderen Stämme signifikante Abhängigkeiten, d.h. je mehr Embryonen übertragen werden, desto grösser ist die zu erwartende Anzahl von Jungen.

Gesamthft wurden **102 Junge** (23,4% der übertragenen Embryonen) geboren, wovon **85** (19,5%) das zuchtfähige Alter erreichten.

### Zeitlicher Ablauf der Operation

Durch den Schritt zur Keimfreiheit hat sich die Technik des ET nur geringfügig verändert. Es waren vor allem methodische Probleme zu bewältigen, damit die Keimfreiheit erhalten blieb. Mit den gefundenen Lösungen wurde es sogar einfacher, die Regeln der Asepsis zu beachten, da die Maus und sämtliche Instrumente und Unterlagen keimfrei waren.

Die Vorbereitungsarbeiten wurden allerdings aufwendiger und nahmen anderthalb bis zwei Stunden in Anspruch.

#### Zeitlicher Ablauf: Durchschnitt aus 35 Operationen

|                                    |                 |
|------------------------------------|-----------------|
| - 2* Tiere töten, Eileiterentnahme | : 5.30 Minuten  |
| - Spülung der 4* Eileiter          | : 11.50 Minuten |
| - Umziehen, Tier im Äthertopf      | : 11.20 Minuten |
| - Tier rasieren, einspannen        | : 8.15 Minuten  |
| - Operation / Transfer             | : 11.10 Minuten |
| - Haut nähen                       | : 8.15 Minuten  |
| TOTAL                              | : 56.20 Minuten |

Die Extremwerte betrugen 42, bzw. 76 Minuten. Im Verlauf des Versuches kam es zu Verbesserungen der einzelnen Zeiten. Vor allem die Arbeit unter dem Stereomikroskop (Spülung) konnte verkürzt werden. Demgegenüber blieben die Zeiten für die Entnahme der Eileiter und das Nähen nahezu konstant.

---

\* Bei jedem zweiten Transfer war ein weiteres (drittes) Tier nötig, da nur vier von fünf Tieren Embryonen im 8-Zell-Stadium besaßen (20% Verluste, siehe 5.2 Verpaarung). Müssen sechs Eileiter gespült werden, so verlängert sich der Transfer um ca. 6 Minuten.

## 5.4 Embryonen

### 5.4.1 Mikroskopische Beurteilung

Die Embryonen wurden im 8-Zell-Stadium in den Uterus transferriert.

Bei den Stämmen C57BL/6 und DBA/2J hatten zum Operationszeitpunkt (Vormittag) ca. 3/4 aller Embryonen das 8-Zell-Stadium erreicht. Die übrigen waren entweder unbefruchtet oder in der Entwicklung zurückgeblieben (bis 4-Zell-Stadium). Die Operation erfolgte also zu einem Zeitpunkt, in dem eine Unterteilung in vitale und weniger vitale Embryonen gut möglich war.

(Das gleichzeitige Auftreten von befruchteten, degenerierten und unbefruchteten Eizellen ist normal [1,32].)

Im Gegensatz dazu befanden sich die Embryonen der BALB/c-Tiere zum gleichen Zeitpunkt erst im 4-Zell-Stadium. Auch diese Besonderheit wurde in der Literatur schon beschrieben [75]. Durch Verschiebung der Operation auf den Nachmittag (Differenz 4 Stunden) konnte diesem Umstand Rechnung getragen werden.

Die Zahl der effektiv brauchbaren Embryonen pro Spülung und Tier bei den verschiedenen Stämmen konnte aus den Tabellen 7 - 9 berechnet werden. Sie beträgt für die verwendeten Stämme:

|           |                  |
|-----------|------------------|
| C57BL/6J  | : 6,75 Embryonen |
| DBA/2J    | : 9,30 Embryonen |
| BALB/cByJ | : 6,60 Embryonen |

Bei den Transfers Nummer 23 und 24 wurde die Zeitdifferenz des Stammes BALB/c bei der Embryonalentwicklung nicht berücksichtigt. Aus den übertragenen 4-Zell-Stadien resultierten keine Trächtigkeiten. Diese beiden Transfers werden deshalb in dieser Arbeit nicht weiter aufgeführt.

#### 5.4.2 Vitalfärbung mit FDA

Die Färbung und Beurteilung erfolgte unmittelbar nach der Spülung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Sämtliche Blastomeren leuchteten grün auf, auch unbefruchtete Eizellen und solche, die offensichtlich zerstört waren. Die Vitalfärbung ist deshalb zur Erkennung einer physikalischen Schädigung der frisch gespülten Embryonalstadien ungeeignet. Ihr Einsatz bleibt der Kryokonservierung vorbehalten, wo nach längerer Lagerung und anschliessendem Auftauen eine Kontrolle stattfinden soll.

### 5.5 Kontrollen

#### 5.5.1 Mikrobiologische Kontrolle

Zu Beginn der Versuche wurden die erwarteten Resultate erreicht, d.h. keimfreie Tiere blieben auch nach der Operation (Vasektomie, Embryotransfer) keimfrei.

In der Zeit zwischen der vierten und sechsten Operation musste eine Kontamination mit einer Clostridien-spp. festgestellt werden. Trotz intensiver Bemühungen blieb unklar, bei welcher Gelegenheit dieser Keim in das System eindringen konnte. Die verschiedenen Möglichkeiten (Schleusvorgang, Operation, Autoklav) werden in der Diskussion besprochen.

Besonders gravierend wirkte sich aus, dass trotz intensiver Kontrollen die Kontamination erst sechs bis acht Wochen später entdeckt wurde. Auch Sektionen, die regelmässig durchgeführt wurden, liessen nie den Verdacht einer Kontamination aufkommen; insbesondere war das Caecum nicht kleiner geworden [34,50]. In der Zwischenzeit wurde ahnungslos weitergearbeitet, d.h. die Isolatoren wurden intensiv untereinander gekoppelt, und Tiere nach Bedarf hin und her verschoben.

Nach der Entdeckung der Kontamination wurden die weiteren Arbeiten für zwei Wochen unterbrochen, und alle Isolatoren einer zusätzlichen Kontrolle unterzogen. Dabei stellte sich heraus, dass einer der Verpaarungsisolatoren ebenfalls mit diesem Keim behaftet war.

Die weiteren Embryotransfers wurden deshalb mit monoassoziierten Tieren durchgeführt. Eine weitere, zusätzliche Kontamination fand nicht statt.

Eine genaue Identifikation des Keimes war nicht möglich. Es handelte sich jedoch um ein gram-positives, strikt anaerobes, sporenbildendes Stäbchen, und somit definitionsgemäss um ein Clostridium. Die weiteren Abklärungen verliefen alle negativ, da sich das Bakterium nicht anzüchten liess. In den biochemischen Reihen fand trotz mehrfacher Ausführung kein Wachstum auf den dafür vorgesehenen Medien statt (Tabelle 15).

Tabelle 15: verwendete Medien.

- Bunte Reihe für Clostridien

(Peptone yeast, esculin, fructose, glucose, lactose, maltose, mannitol, mannose, melibiose, ribose, starch, sucrose, milk, xylose, gelatin, chopped meat, agar deep, urease, egg yolk)

- Api 20 A

(Indole, urease, glucose, mannitol, lactose, saccharose, maltose, salicin, xylose, arabinose, gelatin, esculin, glycerin, cellobiose, mannose, melezitose, raffinose, sorbitol, rhamnose, trehalose, catalase, spore, gram)

Resultate: - Gelatine wird verflüssigt

- beweglich
- subterminale Sporen (Malachitgrün-Färbung)
- teilweise: Mannose, Ribose abbauend

## Spezialmedien

Auf den folgenden Spezialmedien sollte eine genügend grosse Menge des Keimes gewonnen werden, um mittels Gaschromatographie ein Fettsäuremuster erstellen zu können.

### - ungeeignete Medien

Thioglykolat-Bouillon ohne Zusatz

Thioglykolat-Bouillon mit Zusatz von Tween 80

Thioglykolat-Bouillon mit Zusatz von Pansensaft (30%)

Thioglykolat-Bouillon mit Zusatz von Kotsuspension (10%)

Thioglykolat-Bouillon mit Zusatz von Zellulose

Thioglykolat-Bouillon mit Zusatz von gemahlenem Futter

Thioglykolat-Bouillon mit Zusatz von Einstreu

Leber-Leber-Bouillon

Blut-Agar

Brucella-Agar

Trypticase-Soya-Agar (TSA)

TSA mit Zusatz von Kot (10%)

TSA mit Zusatz von Pansensaft (30%)

### - geeignete Medien

Thioglykolat-Bouillon mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum:

Der Keim wächst in Form von feinen, weissen Flöcklein.

Kochblut-Agar: Der Keim wächst in Form feiner, ca. 0,5 - 1 mm grosser, farbloser Kolonien.

Die Identifikation gelang trotzdem nicht [6,39]. Immerhin konnte mit diesen beiden Medien die Uterusrelevanz des Keimes abgeklärt werden (siehe Diskussion).

In diesem Zusammenhang sei auf die Arbeit von HAZENBERG et al. [34] verwiesen, die zeigte, dass 6 von 7 Clostridien-spp. im Mäusekot nicht identifizierbar waren. Weitere Literaturstellen belegen, dass strikt anaerobe Bakterien aus dem Verdauungstrakt von Mäusen vielfach biochemisch inert sind [42,47,48].

### 5.5.2 Genetische Kontrolle

Es traten keine Farbveränderungen auf, d.h. die geborenen Jungen entsprachen phänotypisch den Spendertieren. Die Würfe waren homogen, sowohl innerhalb des Tieres (evtl. Chimären-, Mosaikbildung) als auch innerhalb des Wurfes (Fehler bei der Vasektomie, was zu einer Superfekundation geführt hätte), so dass diese Kontrolle ein zusätzlicher Beweis für die gelungene Vasektomie darstellt.

### 5.5.3 Jungtiere, Aufzucht

Die ersten Stunden nach dem Werfen sind für das Ueberleben der Neugeborenen von entscheidender Bedeutung. Vor allem lebensschwache Feten schaffen die Umstellung weniger gut. Nach Literaturangaben [22] beträgt diese Todesrate bis zu 33%. In unseren Untersuchungen starben 12 von 102 Jungen (11,8%) unmittelbar post partum. Es ist auffallend, dass sämtliche perinatalen Todesfälle in Würfen mit nur wenigen Jungen (1 - 3) auftraten. Vielfach waren die Jungen angefressen. Messungen an unversehrten toten Jungen ergaben, dass diese nicht untergewichtig waren, sondern ihr Gewicht sogar rund 10 % über der Norm lag. So wog z.B. ein DBA/2J-Junges 1,45 Gramm gegenüber den erwarteten 1,3 Gramm.

Um diesen Sachverhalt besser darzustellen, sind die Ergebnisse der Transfers in der Reihenfolge der Jungen nochmals aufgeführt (Tabelle 16).

Tabelle 16

| Transfer-<br>Nummer | Junge | m : w |      | Verluste:      |               | Zucht-<br>paar-<br>bildung | Rest |
|---------------------|-------|-------|------|----------------|---------------|----------------------------|------|
|                     |       |       |      | peri-<br>natal | Auf-<br>zucht |                            |      |
| C57BL/6             | 3     | 0     | -    | -              | -             | -                          | -    |
|                     | 5     | 1     | -    | 1              | -             | -                          | -    |
|                     | 9     | 2     | 2: 0 | -              | -             | -                          | 2 m  |
|                     | 4     | 3     | 1: 0 | 2              | -             | -                          | 1 m  |
|                     | 8     | 3     | 3: 0 | -              | -             | -                          | 3 m  |
|                     | 6     | 3     | 2: 1 | -              | -             | 2                          | 1 m  |
|                     | 1     | 4     | 2: 1 | -              | 1             | 2                          | 1 m  |
|                     | 7     | 4     | 1: 2 | -              | 1             | 2                          | 1 w  |
|                     | 10    | 6     | 2: 4 | -              | -             | 4                          | 2 w  |
|                     | 2     | 7     | 4: 2 | -              | 1             | 4                          | 2 m  |
| Subtotal            | 33    | 17:10 |      | 3              | 3             | 14                         | 13   |

DBA/2J

|          |    |       |   |   |    |     |   |
|----------|----|-------|---|---|----|-----|---|
| 18       | 0  | -     | - | - | -  | -   | - |
| 12       | 0  | -     | - | - | -  | -   | - |
| 14       | 1  | -     | 1 | - | -  | -   | - |
| 19       | 1  | -     | 1 | - | -  | -   | - |
| 21       | 2  | -     | 2 | - | -  | -   | - |
| 11       | 3  | -     | 3 | - | -  | -   | - |
| 13       | 3  | 1: 1  | 1 | - | 2  | -   | - |
| 15       | 3  | 2: 1  | - | - | 2  | 1 m |   |
| 17       | 3  | 1: 2  | - | - | 2  | 1 w |   |
| 16       | 4  | 2: 2  | - | - | 4  | -   |   |
| 22       | 5  | 0: 5  | - | - | -  | 5 w |   |
| 20       | 6  | 4: 2  | - | - | 4  | 2 m |   |
| Subtotal | 31 | 10:13 | 8 | 0 | 14 | 9   |   |

BALB/c

|          |           |       |   |   |    |     |   |
|----------|-----------|-------|---|---|----|-----|---|
| 31       | gestorben |       |   |   |    |     |   |
| 33       | gestorben |       |   |   |    |     |   |
| 34       | 1         | -     | 1 | - | -  | -   | - |
| 32       | 3         | 0: 3  | - | - | -  | 3 w |   |
| 26       | 3         | 1: 2  | - | - | 2  | 1 w |   |
| 29       | 3         | 2: 1  | - | - | 2  | 1 m |   |
| 28       | 4         | 1: 2  | - | 1 | 2  | 1 w |   |
| 25       | 7         | 2: 5  | - | - | 4  | 3 w |   |
| 30       | 7         | 2: 4  | - | 1 | 4  | 2 w |   |
| 35       | 10        | 6: 4  | - | - | 8  | 2 m |   |
| Subtotal | 38        | 14:21 | 1 | 2 | 22 | 13  |   |

|       |     |       |    |   |    |    |
|-------|-----|-------|----|---|----|----|
| Total | 102 | 41:44 | 12 | 5 | 50 | 35 |
|-------|-----|-------|----|---|----|----|

|   |     |  |      |     |      |      |
|---|-----|--|------|-----|------|------|
| % | 100 |  | 11,8 | 4,9 | 49,0 | 34,3 |
|---|-----|--|------|-----|------|------|

m = Männlich, w = Weiblich

Die anderen fünf Todesfälle traten während der Säugungszeit oder unmittelbar nach dem Absetzen ein. Zwei Tiere des Stammes C57BL/6J wurden wegen einer schiefen Zahnstellung euthanasiert. (Die Missbildungsrate beim diesem Stamm beträgt 5 - 10% [23, 38].)

Ein Tier des Stammes BALB/cByJ wurde beim Umsetzen fallengelassen; es wies eine Schädelverletzung auf.

Bei den letzten beiden Tieren konnte die Todesursache nicht eruiert werden.

#### 5.5.4 Zuchtpaare, Nachzucht

Der Embryotransfer zur Gewinnung keimfreier Mäuse kommt aufgrund des Aufwandes nur für besonders wertvolle Tiere, d.h. für pedigrierte Stammtiere, in Frage. Hier ist man zur strikten Bruder-Schwester-Paarung verpflichtet. Ein ungünstiges Geschlechtsverhältnis innerhalb eines Wurfes kann deshalb die Ursache hoher Tierverluste sein. Wie Tabelle 16 zeigt, betragen sie in unserem Falle 34,3%. Selbst fünf Junge bieten noch keine Gewähr, auch nur ein einziges Pärchen zu bilden (siehe Transfer Nummer 22).

Von den 102 geborenen Jungen erreichten 85 das zuchtfähige Alter. Aus diesen Tieren konnten 25 Zuchtpaare zusammengestellt werden:

- C57BL/6J : 7 Pärchen
- DBA/2J : 7 Pärchen
- BALB/cByJ : 11 Pärchen

Im Alter von 6 Wochen wurden die Tiere aus dem Isolator in eine SPF-Einheit umgeschleust, wobei das Unterlassen der gezielten Besiedlung mit einer Darmflora keine negativen Einflüsse hatte. Die Verpaarung fand eine Woche später statt.

Erst nach drei Würfen konnte die Leistungsfähigkeit einer Zuchtlinie schlüssig beurteilt werden. Es wurden deshalb drei Würfe abgewartet. Beim Stamm C57BL/6J ergaben sämtliche Paarungen genügend Junge, während bei den Stämmen BALB/cByJ und DBA/2J je ein Pärchen nur einen einzigen Wurf hatte. Die Nachkommen dieser Tiere (2.Generation = F<sub>2</sub>) züchteten jedoch weiter, so dass gesamthaft betrachtet die Nachzuchtleistung der Transfertierte in jeder Beziehung zufriedenstellend war.

### 5.6 Hysterektomie

Anhand der Protokolle konnten folgende Durchschnittswerte ermittelt werden:

- vorzeitiges Werfen (Hysterektomie übergangen): 50%,
- Feten nach Hysterektomie noch nicht geburtsreif: 12%.

Somit wurde die Hysterektomie in 38% der Fälle zum richtigen Zeitpunkt vorgenommen. Von den daraus entwickelten Feten erwiesen sich 84% als vital, so dass sie einer Amme unterlegt werden konnten. Davon starben 40%, sei es, weil sie nicht rechtzeitig Milch bekamen, oder weil die Amme die Jungen nicht annahm. Die Ueberlebensrate von 60% entspricht einem mittleren Wert [3,71].

Ausgehend von den trächtigen Tieren konnten 19,2% der Jungen durch Hysterektomie gewonnen werden. Da die vorzeitig werfenden Tiere nicht verloren sind, werden für den Vergleich zwischen Embryotransfer und Hysterektomie nur die erfolgreich abgesetzten Jungtiere der ausgeführten Hysterektomien herangezogen. Diese Rate beträgt **38,4%**.

Die mikrobiologischen Untersuchungen der letzten Jahre verliefen negativ.

## 6. Diskussion

In der Diskussion sollen die folgenden Teilgebiete besprochen werden:

- Die Resultate des Transfers.
- Die mikrobiologischen Aspekte der angewandten Technik.
- Der Vergleich zwischen Transfer und Hysterektomie.

### 6.1 Resultate des Transfers

Mit 23,4% geborenen Jungen (Resultate von 0 bis 66,7%), bzw. mit 19,5% abgesetzten Jungtieren, befinden sich die Resultate deutlich unter 50%, die McLAREN und MICHIE [56] früher postuliert, selber jedoch nie erreicht hatten. Hingegen sind die Resultate im Vergleich zu anderen Arbeiten [9,22,55,63,87] als gut zu bewerten. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wird dadurch erschwert, dass von unterschiedlichen Bezugsgrößen ausgegangen wird, je nachdem, ob die Anzahl erfolgreicher Implantationen oder die Anzahl geborener bzw. abgesetzter Jungen in Relation zur Anzahl der übertragenen Embryonen gebracht wird. Die Angabe der abgesetzten Jungtiere scheint am aussagekräftigsten, da sämtliche negativen Einflüsse mitberücksichtigt sind. Zudem kann eine Einteilung in tote, lebensschwache und vitale Feten, nach Euthanasie des Muttertieres am 18. Trächtigkeitstag, nicht eindeutig erfolgen [76]. WIEDING [87] erzielte bei C57BL/6J/Han am 10. Tag der Trächtigkeit 73% Implantationsstellen, jedoch nur 14,1% lebende Feten bei der Geburt. Auch sind die Aufzuchtverluste nach ET erhöht, sie betragen bis zu einem Drittel aller zur Welt gekommenen Jungen [22]. In dieser Arbeit betrugen sie 16,7%, und zwar vor allem bei Würfen mit weniger als 3 Jungen. Daraus kann geschlossen werden, dass der Grund für die erhöhte Sterblichkeit nicht nur bei den Jungen selbst, sondern auch in einem gestörten Verhalten der Mutter zu suchen ist. Mütter mit wenig Jungen zeigten vielfach ein nervöses Verhalten, rannten im ganzen Käfig herum oder scharrten gar die Jun-

gen zu. Möglicherweise wird der Muttertrieb durch die geringe Wurfgrösse nicht oder nur ungenügend aktiviert, oder die Milchbildung zuwenig angeregt. GRUENEGER [28] schätzt, dass bei primiparen Mäusen regelmässig 1 - 2 Junge zusätzlich zu Plazenta und Eihäuten gefressen werden.

Die unterschiedlichen Erfolgsraten bei den drei berücksichtigten Stämmen (DBA/2J, C57BL/6J, BALB/cByJ) lassen sich auf Unterschiede innerhalb der Stämme zurückführen. FEKETE und LITTLE [22] berichteten schon im Jahre 1942, dass mit dem Stamm C57BL bessere Resultate erzielt wurden als mit dem Stamm DBA. SCHNEIDER und HAHN [70] führen die bessere Entwicklungsfähigkeit von F<sub>1</sub>-Hybriden auf die allgemein erhöhte Vitalität dieser Tiere zurück. WIEDING [87] kommt zu einem ähnlichen Ergebnis und formuliert es folgendermassen:

- "1. Die Eizellen von Stämmen mit hoher Fruchtbarkeit überleben in verschiedenen Uterusmilieus besser als die Eizellen weniger fruchtbaren Vergleichsstämme. Dieses zeigt den Einfluss des embryonalen Genotyps.
2. Genetisch identische Eizellen überleben im Uterusmilieu des fruchtbaren Stammes besser als im Uterusmilieu des weniger fruchtbaren Vergleichsstammes. Hierdurch wird der Einfluss der mütterlichen Umgebung auf das Ueberleben des Embryos deutlich."

Die Möglichkeit eine Erhöhung der Resultate durch eine Verbesserung des Uterusmilieus zu erreichen, ist gering, da als Empfängertiere bereits Tiere eines sehr fruchtbaren Stammes verwendet wurden (Auszuchtstamm Zur:ICR). Allenfalls können die perinatalen Todesfälle durch die Verwendung von erfahrenen Müttern (foster mothers) gesenkt werden [63]. Da als Empfängertiere immer der gleiche Stamm verwendet wurde, spiegeln die Resultate die Fruchtbarkeit der verwendeten Stämme wider. Die Reihenfolge DBA/2J, C57BL/6J und BALB/cByJ trifft dabei auf die natürlichen Verhältnisse zu [23].

Es ist zwar möglich, durch Superovulation eine erhöhte Ausbeute an Eizellen bei Stämmen mit geringer Fruchtbarkeit zu erzielen,

doch sinkt dabei deren Befruchtungsfähigkeit. SCHNEIDER und HAHN [70] berichteten, dass die Ovulationsrate nach Applikation von PMSG und HCG auf rund das Doppelte gesteigert werden konnte, gleichzeitig aber die Befruchtungsfähigkeit dieser Eizellen von 44,2% auf 36,8% abnahm. Rechnerisch lässt sich daraus eine Steigerung an brauchbaren Embryonen um 60% ermitteln. Multipliziert man die unter 5.4 ermittelte Anzahl an brauchbaren Embryonen mit diesem Faktor, so können neu zwischen 10 - 15 brauchbare Embryonen pro Tier und Spülung erwartet werden. Ob dies genügt, um die Reproduktionsleistung eines Inzuchtstammes wesentlich zu steigern, muss in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

Die Erfolgsrate ist in entscheidendem Mass von der Erfahrung und der Routine des Operateurs abhängig [57,63,76]. SCHNEIDER und HAHN [70] fanden zwischen zwei Operateuren bei exakt gleicher Arbeitsweise Unterschiede von 14%.

Obwohl 36 durchgeführte Transfers im Rahmen eines Vorversuches eine ausreichende Erfahrung gebracht haben, mag beim Stamm C57BL/6J die noch etwas fehlende Routine der keimfreien Operation eine Rolle gespielt haben. Darin könnte auch der Grund für die fehlende Korrelation zwischen den übertragenen Embryonen und den geborenen Jungen beim Stamm C57BL/6J gesehen werden, denn mit steigender Zahl übertragener Embryonen können auch mehr geborene Junge erwartet werden. Diese Aussage bestätigte sich auch in der vorliegenden Arbeit, zumindest im Bereich von 5 bis 21 transferierten Embryonen, und deckt sich mit den Resultaten von McLAREN und MICHIE [56,57].

Für die fehlende Korrelation beim Stamm C57BL/6J kommen auch methodische Fehler in Betracht; z.B. wurde beobachtet, dass ein Teil der in den Uterus eingeblasenen Flüssigkeit nach dem Herausziehen der Pipette aus der noch bestehenden Perforation wieder ausfloss. Die Kontrolle über den Verbleib der Embryonen ist schwer zu realisieren. Verluste beim Aufziehen der Embryonen gab es keine, nach dem Ausblasen waren die Pipetten immer leer. Trotzdem können Embryonen beim Handling verloren gehen. Wird

die Pipette beim Aufziehen und Ausblasen der Embryonen mit ungleicher Neigung gehalten, so fliesst beim Berühren einer feuchten Fläche (Uterus) Flüssigkeit aus orthostatistischen Gründen aus. Durch eine sehr steile Haltung der Pipette beim Aufziehen konnte ein Ausfliessen weitestgehend vermieden werden.

## 6.2 Mikrobiologie

Wie aus den Resultaten ersichtlich ist, kam es zu einer Kontamination, die lange Zeit nicht bemerkt wurde. Nach der Entdeckung in einem Isolator wurden alle übrigen Isolatoren einer zusätzlichen Kontrolle unterzogen, wobei sich herausstellte, dass 6 von 8 Isolatoren mit dem gleichen Keim kontaminiert waren. Darunter gab es Isolatoren, die erst 2 Wochen vorher überprüft und aufgrund der Ergebnisse als keimfrei beurteilt wurden, obwohl sie schon damals mit dem Keim behaftet gewesen sein mussten.

Durch weiteren Austausch von Tieren aus dem kontaminierten Zuchtisolator kam es zu der erwähnten Verbreitung des Keimes in 6 weitere Isolatoren.

Aufgrund der aufgezeichneten Schleusvorgänge liessen sich die Kontaminationsmöglichkeiten zeitlich zwischen dem 18. Februar 1986 und dem 14. März 1986 eingrenzen. Aus dem besagten Zuchtisolator wurden 4 Schleusungen ausgeführt:

- 1 x Einstreu (Autoklaven-Programm: 4 x Vakuum, Sterilisationszeit 16 Minuten bei 134°C.)
- 3 x Tiere. (Umschleusung jeweils in einem Versorgungszyylinder, d.h. es erfolgte bei jedem Isolator ein Anschleusen mit 3%-Peressigsäure bei 40 Minuten Einwirkzeit.

Bei den Tierschleusungen handelte es sich zweimal um Tiere aus Transfers (Nummer 7/8 vom 27. Februar 1986 und Nummer 9/10/11 vom 7. März 1986.) Nach zweimaliger negativer Kontrolle mussten diese 5 Tiere aus Platzmangel in den Zuchtisolator geschleust werden, der zu diesem Zeitpunkt schon teilweise geräumt war.

Die darin noch gehaltenen Weibchen (dritte Tierschleusung) wurden bei der Schleusung der Transfer-Tiere 9 - 11 in einen anderen Isolator überführt. Diese Tiere konnten für die spätere Kontamination der übrigen Isolatoren verantwortlich gemacht werden.

Aufgrund dieser "Retour"-Schleusung von operierten Tieren in den Zuchtisolator kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Kontamination während einer Operation stattgefunden hat; dies, obwohl alle Kot-Untersuchungen negativ waren. Zwei Sektionen, die ebenfalls während der fraglichen Zeit ausgeführt wurden, gaben keine Hinweise für die latent vorhandene Kontamination.

Bei der Versuchsplanung ging man von der Ueberlegung aus, dass Kontaminationen während der Operation am ehesten von der Haut des Operateurs (Staphylokokken, Bazillen) oder aus dem Darm eines Spendertieres (Enterbacteriaceae) ausgehen könnten. Diese Keime lassen sich in der Regel schnell nachweisen und differenzieren, so dass mit wöchentlichen Untersuchungen ein sicherer Nachweis erwartet werden durfte.

Die Ausbreitung des Keimes innerhalb der Isolatoren wurde durch einen Arbeitsunterbruch noch begünstigt. Während dieser Zeit wurden keine Kontrollen durchgeführt, und so erklärt sich das plötzliche Wechseln von 6 der 8 Isolatoren vom keimfreien zum monoassozierten Zustand.

Die mikrobiologischen Untersuchungen ergaben, dass es sich beim Keim um ein strikt anaerobes, sporenbildendes gram-positives Stäbchen handelt. Der Nachweis gelang am sichersten mit TGF und einem Zusatz von 10% FCS und anschliessender anaerober Rebrütung auf einer Kochblutplatte bei 37°C. Proben der noch in den kontaminierten Isolatoren verbliebenen Weibchen ergaben, dass sich das Bakterium im gesamten Darmtrakt, am schnellsten und sichersten jedoch im Dünndarm nachweisen liess.

Demgegenüber konnte der Nachweis aus dem Geschlechtstrakt in keinem einzigen Fall erbracht werden. Die Untersuchungen von Spermaflüssigkeit aus dem Uterus frisch gedeckter Tiere, die

Spülung von Uterushörnern zwei Tage post coitum sowie das Einlegen von 14 Tage alten Feten in Nährmedium verliefen alle negativ, womit bewiesen ist, dass dieser Keim keine Relevanz für den Uterus hat.

Es gilt zudem zu bedenken, dass der Uterus (speziell nach einer Brunst) eine hohe Selbstreinigungstendenz aufweist. Er gilt normalerweise als steril [25], doch ist eine diaplazentare Uebertragung gewisser Krankheitserreger (z.B. Viren [72], Pasteurellen [17,24], Mykoplasmen [17,24,71]) möglich. Durch geeignete Massnahmen, wie Auswahl, bzw. Vorbehandlung der Muttertiere kann diesem Umstand Rechnung getragen werden.

Alle Tiere der Abteilung für Labortierkunde unterstehen einer routinemässigen bakteriologischen, parasitologischen, z.T. virologischen Kontrolle. Die Methoden lehnen sich eng an die von BONATH und KUNSTYR [8] empfohlenen Richtlinien zur Ueberwachung von Versuchstierbeständen an.

Die für diese Arbeit verwendeten Tiere waren alle klinisch gesund, und frei von "Uteruskeimen". Als letzter Beweis sei angeführt, dass Hysterektomien, die vor, bzw. nach diesem Versuch durchgeführt wurden, bei Verwendung analoger Tiere keimfrei verliefen.

### Schleusungen

Auch beim Schleusvorgang hätte die Kontamination stattfinden können. Wie erwähnt fand die Sterilisation der Manschette jeweils mit 3%-iger Peressigsäure ( $\text{pH} = 2,4$ ) bei einer 40 minütigen Einwirkzeit statt. Peressigsäure wirkt durch die Abspaltung von freiem, aktivem Sauerstoff und ist ein sehr zuverlässiges Sterilisationsmittel. Sie soll sich laut Firmenangabe speziell zur Abtötung von Sporenbildnern eignen.

Mögliche Fehlerquelle beim Schleusen wäre eine unkorrekte Anwendung der Peressigsäure. So muss die Lösung jeden Morgen frisch zubereitet werden. Die Manschetten sind sauber und vor

allem fettfrei zu halten, da sonst Keime unter der Fettschicht vor der wässrigen Lösung geschützt sind. Besondere Bedeutung kommt hier der Reinigung des Ärmels der Manschette zu.

### Einstreu

Der Keim hätte ebenfalls mit ungenügend sterilisierter Einstreu in den Isolator eingeschleppt werden können. Diese Annahme ist bei korrekter Bedienung des Autoklaven sehr unwahrscheinlich, doch kann die Möglichkeit einer Fehlmanipulation durch Wählen eines falschen Programmes nicht ausgeschlossen werden, da zu diesem Zeitpunkt das Farbband des Autoklavenschreibers defekt war.

Gesamthaft betrachtet darf angesichts des Auftretens eines einzigen Keimes während der ganzen Versuchszeit die angewandte Methode als sicher bewertet werden. Eine einzige Kontamination auf 14 Operationen entspricht nur ca. 7%, wobei eben nicht bewiesen ist, dass der Keim während einer Operation ins System gelangte.

Um das Risiko einer Verschleppung eines Keimes bei einem ähnlich gelagerten Versuch zu vermindern, müsste der Aufwand weiter vergrößert werden (mehr Isolatoren, grössere Intervalle zwischen den Operationen).

Die grundsätzliche Frage, weshalb die Kontamination mit einem so speziellen Keim erfolgen konnte, bleibt ungeklärt. In diesem Zusammenhang sei auf die Arbeit von TAYLOR [77] verwiesen, der in seinen Isolatoren ein ähnliches Bakterium fand. Auch ihm war es nicht möglich, den Keim näher zu identifizieren. Er führte dabei die Infektionsquelle auf fehlerhaft sterilisiertes Futter (Gamma-Strahlen) zurück.

### Vergleich zwischen Transfer und Hysterektomie

Keimfreie Tiere wurden bis anhin mittels Hysterektomie gewonnen. Ein Vergleich der beiden Verfahren drängt sich deshalb auf.

Ausgehend von den ausgeführten Hysterektomien (nicht berücksichtigt bleiben die Verluste, die durch ein vorzeitiges Werfen bedingt sind), können folgende Parameter verglichen werden:

1. Die den Ammen unterlegten Jungen im Vergleich zu den geborenen Jungen des Transfers.
2. Die abgesetzten und für eine Verpaarung geeigneten Jungtiere.

Beim Transfer führten gesamthaft betrachtet 23,4% der übertragenen Embryonen zu Jungen, die Zahl der abgesetzten Jungtiere betrug **19,5%**. Bei der Hysterektomie konnten 63,8% der gewonnenen Jungen einer Amme unterlegt werden. Davon starben jedoch 40%, so dass nur gerade **38,3%** aller aus dem Uterus entnommenen Jungtiere das zuchtfähige Alter erreichten. Statistisch liess sich die Ueberlegenheit der Hysterektomie nicht absichern. Es gilt jedoch zu bedenken, dass die Hysterektomie andere Vorteile aufweist, z.B. benötigt man keine unterbundenen Männchen. Diese nahmen zwei Isolatoren in Anspruch, welche auch versorgt werden mussten. Zeitlich bedeutet dies einen halben Tag Arbeit pro Woche für zwei Personen.

Ein weiterer Vorteil ist, dass die Zyklusbestimmung weniger genau sein darf, da die Tragzeit bei den Mäusen schon physiologischerweise Schwankungen im Bereich eines Tages aufweist (zB. Zur:ICR = 19  $\pm$  1 Tag).

Auch auf das Stereomikroskop und alle übrigen bei der Spülung und Narkose verwendeten Geräte und Reagenzien kann verzichtet werden.

Neben dem rein materiellen Mehraufwand des Transfers soll auch ein Vergleich unter dem Aspekt des Tierschutzes angestellt werden. Bei beiden Verfahren werden die Spendertiere mittels zervikaler Dislokation getötet. Hingegen entfällt bei der Hysterektomie jeglicher Eingriff für das Ammentier. Es werden lediglich zusätzliche Junge unterlegt, allenfalls werden ihre eigenen entfernt. Die Situation widerspiegelt sich im schweizerischen Recht dadurch, dass für die Hysterektomie nur eine Melde-, für den ET jedoch eine Bewilligungspflicht besteht. Feten gelten als Organe. Erst mit der Geburt werden sie zu eigenständigen Lebewesen. Es handelt sich bei der Hysterektomie um eine "fachgerechte Tötung eines Spendertieres mit anschliessender Organentnahme" [15].

#### 6.4 Schlussfolgerungen

1. Mit der beschriebenen Methode können Mäuse keimfrei gewonnen werden. Das Risiko einer bakteriellen Kontamination ist gering.
2. Unsere Untersuchungsergebnisse zeigten, dass hinsichtlich der Anzahl abgesetzter Jungtiere zwischen Hysterektomie und Embryotransfer (ET) keine statistisch signifikanten Unterschiede bestanden. Der ET eignet sich dennoch kaum als Alternative zur Hysterektomie, da er mit einem viel grösseren Aufwand verbunden ist. Dieser Nachteil kann möglicherweise auch unter Zuhilfenahme der Superovulation nicht wettgemacht werden.
3. Der ET ist der erste Schritt zur Kryokonservierung von Embryonen. Dadurch können kurzfristig nicht gefragte Stämme eingefroren und die Zucht bei Bedarf wieder aktiviert werden (Embryonenbank).

Nach einer Konservierung wird der ET mit Vorteil direkt auf keimfreie Tiere ausgeführt, da dadurch der anschliessende Reinigungsschritt einer Hysterektomie entfällt. Der zusätzliche Aufwand des keimfreien Transfers rechtfertigt sich durch die Zeitersparnis, die besseren Ergebnisse infolge Ausbleibens jeglicher bakterieller Kontamination der Wunde sowie durch den Wegfall der mit einer Hysterektomie verbundenen Tierverluste.

## 7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit ist der Embryotransfer (ET) bei der Maus beschrieben. Zur Gewinnung von Embryonen wurden die Eileiter konventionell gehaltener Mäuse am 3. Tag post coitum (Tag des Vaginalpfropfes = Tag 1) gespült. Die Embryonen wurden morphologisch untersucht und anschliessend in die Uteri keimfreier, pseudogravider Weibchen transferiert. Dadurch konnten ebenfalls keimfreie Junge gewonnen werden.

Insgesamt wurden 32 Weibchen operiert, wovon 2 unmittelbar post operationem starben. Von den übrigen 30 Tieren wurden 27 (90%) trächtig und gebaren gesamthaft 102 Junge. Dies entspricht 23,4% der übertragenen Embryonen, wobei stamesspezifische Unterschiede auftraten.

Die Methode eignet sich gut, auch routinemässig Embryotransfers durchzuführen, ohne dass dabei die Keimfreiheit verloren geht. Das Risiko einer bakteriellen Kontamination ist sehr gering. Während der gesamten Versuchsdauer kam es nur einmal zu einer Kontamination mit einem nicht näher identifizierbaren Clostridium.

## SUMMARY

The present work describes the embryo transfer (ET) in the mouse. For embryo collection the oviducts of conventionally reared females were flushed on day 3 post coitum (day of the vaginal plug = day 1). The embryos were examined morphologically before transferring them under sterile conditions into the uteri of germ-free pseudopregnant mice. With the method described, germ-free litters were born and reared in the isolators.

Of a total of 32 operated females 2 animals died immediately after the operation. 27 of the remaining 30 foster mothers be-

came pregnant (90%) and gave birth to a total of 102 youngs. This corresponds an average of 23,4% of the transferred embryos. Strain-specific differences were found.

This method is suitable for performing ET on a routine basis without losing the germ-free state. The risk of bacterial contamination is minimal. Throughout the experimental period there was only one contamination with an undetermined *Clostridium*-species

## 8. Literaturverzeichnis

- 1 AVERILL R.L.W., (1958)  
The production of living sheep eggs.  
J. Agr. Sci. **50**, 17 - 33.
- 2 AVERILL R.L.W., ADAMS C.E., ROWSON L.E.A., (1955)  
Transfer of mammalian ova between species.  
Nature **176**, 167 - 168.
- 3 BARTHOLOMEW J.L., TEZAK T.M., MONTREY R.D., (1984)  
Effects of anesthetics and foster mother experience on survival rate of cesarean derived, foster suckled rat pups.  
Lab. Anim. Sci. **34**, 598 - 601.
- 4 BEATTY R.A., (1951)  
Transplantation of mouse eggs.  
Nature **168**, 995.
- 5 BENNET J.P., VICKERY B.H., (1970)  
Rats and mice.  
In: HAFEZ E.S.E.: Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. pp. 299 - 315.  
Lea & Febiger / Philadelphia  
ISBN 0-8121-0295-9.
- 6 BERGEY's, (1974)  
Manual of determinative bacteriology.  
8th Edition, pp. 529 - 575.  
The Williams & Wilkins Company / Baltimore  
ISBN 0-683-01117-0.
- 7 BOLIN S.R., RUNNELS L.J., SAWYER C., GUSTAFSON D.P., (1982)  
Experimental transmission of pseudorabies virus in swine by embryo transfer.  
Am. J. Vet. Res. **43**, 278 - 280.
- 8 BONATH K., KUNSTYR I., (1983)  
Schwerpunkte der Infektionsüberwachung in Versuchstierbeständen.  
Schriftenreihe Versuchstierkunde, No. 10  
Paul Parey Verlag / Berlin und Hamburg  
ISBN 3-489-76018-2.
- 9 BOOT L.M., MUEHLBOCK O., (1953)  
Transplantations of ova in mice.  
Acta Physiol. Pharm. Neerlandica **3**, 133 - 136.
- 10 BRADEN A.W.H., (1957)  
The relationship between the diurnal light cycle and the time of ovulation in mice.  
J. Exp. Biol. **34**, 177 - 188.

- 11 BRADFORD G.E., KENNEDY B.W., (1980)  
Genetic aspects of embryo transfer.  
Theriogenology **13**, 13 - 26.
- 12 BREM G., (1986)  
Mikromanipulation an Rinderembryonen und deren Anwendungsmöglichkeiten in der Tierzucht.  
Ferdinand Enke Verlag / D-7000 Stuttgart  
ISBN 3-432-95451-4.
- 13 BRONSON F.H., DAGG C.P., SNELL G.D., (1966)  
Reproduction.  
In: GREEN E.L.: Biology of the laboratory mouse.  
2nd Edition, pp. 187 - 204.  
McGraw-Hill Book Company / New York  
Library of Congress Catalog Card Number 65-27978 32094.
- 14 BUNCH T.D., FOOTE W.C., WHITAKER B., (1977)  
Interspecies ovum transfer to propagate wild sheep.  
J. Wildlife Management **41**, 726 - 730.
- 15 BUNDESAMT FUER VETERINÄRWESEN, (1986)  
Richtlinien für die Beurteilung von Bewilligungsgesuchen für Tierversuche.  
Swiss Vet **10a/86**, 45 - 49.
- 16 CAMPEAN N., CAMPEAN C., ROSENBAUER K.A., (1980)  
Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Vaginalpfropfentstehung bei Laboratoriumstieren.  
Z. Versuchstierk. **22**, 50 - 62.
- 17 CASILLO S., BLACKMORE D.K., (1972)  
Uterine infections caused by bacteria and mycoplasma in mice and rats.  
J. Comp. Path. **82**, 477 - 482.
- 18 CHURCH R.B., SHEA B., (1976)  
Some aspects of bovine embryo transfer.  
In: ROWSON L.E.A.: Egg transfer in cattle. pp. 73 - 86.  
Commission of the European communities **EUR 5491**.
- 19 DAVID J.S.E., JONES W.A., NEWCOMB R., SMITH G.F., WISHART D.F., (1976)  
Embryo transfer with particular reference to cattle.  
BVA Editorial Services, 7 Mansfield Street, London W1M 0AT  
ISBN 0-901028-06-1.
- 20 DZUIK P., (1975)  
Embryo transfer: An experimental tool with practical applications.  
BioScience **25**, 102 - 106.

- 21 ENDERS A.C., (1970)  
Fertilization, cleavage, and implantation.  
In: HAFEZ E.S.E.: Reproduction and breeding techniques for  
laboratory animals. pp. 137 - 156.  
Lea & Febiger / Philadelphia  
ISBN 0-8121-0295-9.
- 22 FEKETE E.M.A., LITTLE C.C., (1942)  
Observations on the mammary tumor incidence of mice born  
from transferred ova.  
Cancer Research **2**, 525 - 530.
- 23 FESTING M.F.W., (1979)  
Inbred strains in biomedical research.  
The MacMillan Press Ltd / London  
ISBN 0-333-23809-5.
- 24 FLYNN R.J., SIMKINS R.C., BRENNAN P.C., FRITZ T.E., (1968)  
Uterine infection in mice.  
Z. Versuchstierk. **10**, 131 - 136.
- 25 FORTMEYER H.P., HOSANG K., STOLL L., (1973)  
Ueber den Keimgehalt der Uteri trächtiger Meerschweinchen.  
Z. Versuchstierk. **15**, 365.
- 26 FOX R.R., LAIRD C.W., (1970)  
Sexual cycles.  
In: HAFEZ E.S.E.: Reproduction and breeding techniques for  
laboratory animals. pp. 107 - 122.  
Lea & Febiger / Philadelphia  
ISBN 0-8121-0295-9.
- 27 GARDNER R.L., (1978)  
Production of chimeras by injecting cells or tissue into  
the blastocyst.  
In: DANIEL J.C.: Mammalian reproduction, pp. 137 - 165.  
Academic Press, Inc. / London  
ISBN 0-12-201850-8.
- 28 GRUENEBERG H., (1952)  
The genetics of the mouse. III. Reproduction and growth.  
2nd Edition, pp. 6 - 24.  
The Hague Martinus Nijhoff
- 29 GRUENEBERG H., (1954)  
Variation within inbred strains of mice.  
Nature **173**, 674 - 676.
- 30 GWATKIN R.B.L., (1967)  
Passage of meningovirus through the zona pellucida of the  
mouse morula.  
J. Reprod. Fert. **13**, 577 - 578.

- 31 HAFEZ E.S.E., (1970)  
Female reproductive organs.  
In: HAFEZ E.S.E.: Reproduction and breeding techniques for  
laboratory animals. pp. 74 - 106.  
Lea & Febiger / Philadelphia  
ISBN 0-8121-0295-9.
  
- 32 HAHN J., (1978)  
Die unblutige Eigewinnung beim Rind unter Berücksichtigung  
der Vorbereitung der Spendertiere und der Entwicklung der  
Eizellen in Eileiter und Gebärmutter.  
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. **85**, 140 - 145.
  
- 33 HARE W.C.D., MITCHELL D., BETTERIDGE K.J., EAGLESOME M.D.,  
RANDALL G.C.B., (1976)  
Sexing two-week old bovine embryos by chromosomal analysis  
prior to surgical transfer: preliminary methods and results  
Theriogenology **5**, 243 - 253.
  
- 34 HAZENBERG M.P., CUSTERS-VAN LIESHOUT L.M.C., ENGELS W.,  
KOCK-VAN DALEN A.C., (1977)  
The clostridial flora of conventional mice.  
Z. Versuchstierk. **19**, 167 - 174.
  
- 35 HEDRICH H.J., KLUGE R., (1984)  
Genetische Ueberwachung von Inzuchtrattenstämmen. Ein not-  
wendiges Qualitätskriterium für die biomedizinische For-  
schung.  
Z. Versuchstierk. **26**, 273.
  
- 36 HEDRICH H.J., KLUGE R., (1984)  
Genetische Ueberwachung von Ratten-Inzuchtstämmen mittels  
immungenetischer Merkmale.  
Z. Versuchstierk. **26**, 274.
  
- 37 HEDRICH H.J., RAPP K.G., ZSCHEGE C., (1975)  
Untersuchungen zur genetischen Konstanz bzw. Subliniendrift  
von Mäuse- und Ratteninzuchtstämmen.  
Z. Versuchstierk. **17**, 263 - 274.
  
- 38 HEINECKE H., (1972)  
Embryologische Parameter verschiedener Mäusestämme.  
Z. Versuchstierk. **14**, 154 - 171.
  
- 39 HOLDEMAN L.V., CATO E.P., MOORE W.E.C., (1977)  
Anaerobe laboratory manual.  
4th Edition.  
V.P.I. Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute  
and State University, P.O. Box 49, Blacksburg, Virginia
  
- 40 HOLLANDER W.F., STRONG L.C., (1950)  
Intra-uterine mortality and placental fusions in the mouse.  
J. Exp. Zool. **115**, 131 - 149.

- 41 ITOH K., MITSUOKA T., (1980)  
Production of gnotobiotic mice with normal physiological functions. I. Selection of useful bacteria from feces of conventional mice.  
Z. Versuchstierk. **22**, 173 - 178.
- 42 ITOH K., MITSUOKA T., (1985)  
Characterization of clostridia isolated from faeces of limited flora mice and their effect on caecal size when associated with germ-free mice.  
Lab. Anim. **19**, 111 - 118.
- 43 IWAMATSU T., CHANG M.C., (1970)  
Further investigation of capacitation of sperm and fertilization of mouse eggs in vitro.  
J. Exp. Zool. **175**, 271 - 281.
- 44 KIRBY D.R.S., (1962)  
Reciprocal transplantation of blastocysts between rats and mice.  
Nature **194**, 785 - 786.
- 45 KLEINEBRECHT J., DEGENHARDT K.-H., FRÄNZ J., (1970)  
Spontane und induzierte Resorptionen bei der Maus.  
Z. Versuchstierk. **12**, 187 - 200.
- 46 KOOPMAN J.P., JANSSEN F.G.J., (1974)  
The suitability of an intestinal flora with Colonization Resistance Factor for SPF mice, rats and gerbils.  
Z. Versuchstierk. **16**, 164 - 169.
- 47 KOOPMAN J.P., KENNIS H.M., (1977)  
Differentiation of bacteria isolated from mouse ceca.  
Z. Versuchstierk. **19**, 174 - 181.
- 48 KOOPMAN J.P., KENNIS H.M., (1979)  
Characterization of anaerobic cecal bacteria of mice.  
Z. Versuchstierk. **21**, 185 - 191.
- 49 KOOPMAN J.P., WELLING G.W., HUYBREGTS A.W.M., PRINS R.A., MULLINK J.W.M.A., (1981)  
Association of germ-free mice with intestinal microfloras.  
Z. Versuchstierk. **23**, 145 - 154.
- 50 KOOPMAN J.P., PRINS R.A., MULLINK J.W.M.A., WELLING G.W., KENNIS H.M., HECTORS M.P.C., (1983)  
Association of germfree mice with bacteria isolated from the intestinal tract of "normal" mice.  
Z. Versuchstierk. **25**, 57 - 62.
- 51 KOOPMAN J.P., KENNIS H.M., LANKHORST A., WELLING G.W., HECTORS M.P.C., NAGENGAST F., (1986)  
"Normalization" of germfree mice after direct and indirect contact with mice having a "normal" intestinal microflora.  
Lab. Anim. **20**, 286 - 290.

- 52 KUPFERSCHMIED H., (1984)  
Sanitarische Aspekte des Embryotransfers beim Rind.  
Schriften der Schweizerischen Vereinigung für Tierzucht  
**63**, 59 - 65.  
Benteli-Verlag, CH-3018 Bern.
- 53 LEIBO S.P., MAZUR P., (1978)  
Methods for the preservation of mammalian embryos by  
freezing.  
In: DANIEL J.C.: Mammalian reproduction. pp. 179 - 201.  
Academic Press, Inc. / London  
ISBN 0-12-201850-8.
- 54 McLAREN A., (1976)  
Spontaneous chimaeras.  
In: ABERCROMBIE M., NEWTH D.R., TORREY J.G.: Developmental  
and cell biology series, **4**.  
Mammalian chimaeras, pp. 118 - 128.  
Cambridge University Press / Cambridge
- 55 McLAREN A., BIGGERS J.D., (1958)  
Successful development and birth of mice cultivated in  
vitro as early embryos.  
Nature **182**, 877 - 878.
- 56 McLAREN A., MICHIE D., (1956)  
Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine  
foster-mothers.  
I. Factors affecting the implantation and survival of  
native and transferred eggs.  
J. Exp. Biol. **33**, 394 - 416.
- 57 McLAREN A., MICHIE D., (1958)  
Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine  
foster-mothers.  
II. The effect of transferring large numbers of eggs.  
J. Exp. Biol. **36**, 40 - 50.
- 58 MOHR L.R., TROUNSON A.O., (1980)  
The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability  
in the mouse.  
J. Reprod. Fert. **58**, 189 - 196.
- 59 MOLER T.L., DONAHUE S.E., ANDERSON G.B., (1979)  
A simple technique for nonsurgical embryo transfer in mice.  
Lab. Anim. Sci. **29**, 353 - 356.
- 60 NEUMANN F., (1970)  
Hormonale Regulation der Fortpflanzung bei Laboratoriums-  
nagern.  
Z. Versuchstierk. **12**, 162 - 186.

- 61 NIEMANN H., (1980)  
Die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Entwicklungsfähigkeit früher Embryonalstadien von Kaninchen und Rind mit dem FDA- und DAPI-Test.  
Diss. med. vet. / Hannover
- 62 NOYES R.W., DICKMANN Z., (1960)  
Relationship of ovular age to endometrial development.  
J. Reprod. Fert. **1**, 186 - 196.
- 63 RAFFERTY K.A., (1970)  
Methods in experimental embryology of the mouse.  
The Johns Hopkins Press / Baltimore, Maryland 21218  
Standard Book Number 8018-1129-5.
- 64 ROTMAN B., PAPERMASTER B.W., (1966)  
Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters.  
Proc. Natl. Acad. Sci. **55**, 134 - 141.
- 65 ROWSON L.E.A., (1974)  
The role of research in animal reproduction.  
Vet. Rec. **95**, 276 - 280.
- 66 RUNNER M.N., (1951)  
Differentiation of intrinsic and maternal factors governing intrauterine survival of mammalian young.  
J. Exp. Zool. **116**, 1 - 20.
- 67 SAUERBIER I., (1982)  
Unterschiedliche Konzeptionsfähigkeit der weiblichen Han:NMRI Maus. Einfluss der Verpaarung am Abend und am Morgen.  
Z. Versuchstierk. **24**, 161 - 164.
- 68 SCHMIDT R., (1985)  
Ein modifiziertes Verpaarungsregime für die Labormaus.  
Z. Versuchstierk. **27**, 206 - 208.
- 69 SCHNEIDER U., TREIBER A., WERNER J., RODE B., GÄRTNER K., (1980)  
Preimplantation loss in inbred strains of rats.  
Z. Versuchstierk. **22**, 317 - 322.
- 70 SCHNEIDER U., HAHN J., (1975)  
Ergebnisse der in vitro-Befruchtung von Mäuseeizellen unter Berücksichtigung des Stammes, der Hormondosis bei der Superovulation und des BSA-Gehaltes im Befruchtungsmedium.  
Z. Versuchstierk. **17**, 27 - 34.

- 71 SCHULZ K.-D., APPEL K.R., GOETH H., WILK W., (1974)  
Versuche zum Aufbau einer mykoplasmenfreien Rattenzucht.  
Z. Versuchstierk. **16**, 105 - 112.
- 72 SCHWANZER V., DEERBERG F., FROST J., SCHWANZEROVA I., FROST J., PITTERMANN W., (1975)  
Zur intrauterinen Infektion der Maus mit Ektromelie-Virus.  
Z. Versuchstierk. **17**, 110 - 120.
- 73 SHAPLEY D., (1983)  
Techniques for sexing embryos now possible [cattle].  
Nature **301**, 101.
- 74 SNELL G.D., FEKETE E., HUMMEL K.P., LAW L.W., (1940)  
The relation of mating, ovulation and the estrous smear in the house mouse to time of day.  
Anat. Rec. **76**, 39 - 54.
- 75 SNELL G.D., STEVENS L.C., (1966)  
Early embryology.  
In: GREEN E.L.: Biology of the laboratory mouse.  
2nd Edition, pp. 205 - 245.  
McGraw-Hill Book Company / New York  
Library of Congress Catalog Card Number 65-27978 32094.
- 76 TARKOWSKI A.K., (1959)  
Experiments on the transplantation of ova in mice.  
Acta Theriol. **2**, 252 - 267.
- 77 TAYLOR D.M., (1985)  
Monocontamination of germ-free mice by a fastidious unidentified anaerobe.  
Lab. Anim. **19**, 251 - 254.
- 78 THOMAS F.C., SINGH E.L., HARE W.C.D., (1983)  
Embryo transfer as a means of controlling viral infections. III. Non transmission of bluetongue virus from viremic cattle.  
Theriogenology **19**, 425 - 431.
- 79 VON BLARER R., (1986)  
"Retortenbabys": Viele Probleme und Risiken.  
In: Fortpflanzungs- und Gentechnik.  
Tagesanzeiger, 22. und 28. Oktober 1986, CH-8021 Zürich.
- 80 WHITTEN W.K., (1966)  
Pheromones and mammalian reproduction.  
In: McLAREN A.: Advances in reproductive physiology **1**,  
pp. 155 - 177.  
Academic Press / Edinburgh

- 81 WHITTEN W.K., CHAMPLIN A.K., (1978)  
Pheromones, estrus, ovulation, and mating.  
In: DANIEL J.C.: Mammalian reproduction, pp. 403 - 417.  
Academic Press, Inc. / London  
ISBN 0-12-201850-8.
- 82 WHITTINGHAM D.G., (1968)  
Fertilization of mouse eggs in vitro.  
Nature **220**, 592 - 593.
- 83 WHITTINGHAM D.G., (1971)  
Survival of mouse embryos after freezing and thawing.  
Nature **233**, 125 - 126.
- 84 WHITTINGHAM D.G., (1971)  
Culture of mouse ova.  
J. Reprod. Fert. Suppl. **14**, 7 - 21.
- 85 WHITTINGHAM D.G., (1978)  
Viability assays for mammalian ova.  
Cryobiology **15**, 245 - 248.
- 86 WHITTINGHAM D.G., WHITTEN W.K., (1974)  
Long-term storage and aerial transport of frozen mouse embryos.  
J. Reprod. Fert. **36**, 433 - 435.
- 87 WIEDING B., (1982)  
Embryotransfer-Experimente zur Ursachenanalyse der pränatalen Sterberate bei Inzuchtmäusen.  
Diss. med. vet. / Hannover
- 88 WILMUT I., (1972)  
The low temperature preservation of mammalian embryos.  
J. Reprod. Fert. **31**, 513 - 514.
- 89 WILMUT I., (1972)  
The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing.  
Life Sciences **11**, 1071 - 1079.
- 90 WISSDORF H., BAUMGARTEN H., (1987)  
Vorschläge zur Berichtigung und Präzisierung der Transfer-Nomenklatur.  
Zuchthyg. **22**, 8 - 13.
- 91 YAMAMURA H., (1969)  
Individuelle Unterschiede des Entwicklungsstandes bei Embryonen der Maus (C57BL) in der frühen Phase der Organogenese.  
Wilhelm Roux' Archiv **162**, 218 - 242.

- 92 ZEILMAKER G.H., MUEHLBOCK O., LEIBO S., DUX A., (1976)  
Isolation, culture and transplantation of mouse embryos.  
In: UNESCO Roving Seminar  
Fibiger Laboratory / Copenhagen
- 93 ZEROBIN K., (1976)  
Physiologie der Fortpflanzung.  
In: SCHEUNERT / TRAUTMANN: Lehrbuch der Veterinärphysiologie.  
6. Auflage, pp. 710 - 767.  
Verlag Paul Parey / Berlin und Hamburg  
ISBN 3-489-75316-X.

## 9. Verdankungen

Ich danke allen, die in irgendeiner Form zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Im besonderen:

Herrn Prof. Dr. P.E. Thomann für die Ueberlassung des Themas und der Infrastruktur,

Herrn Prof. Dr. K. Zerobin für die Uebernahme des Korreferates,

Herrn Eddy K. Ackerly, Institut für Immunologie Basel, für die Einführung in die Versuchstechnik,

Herrn PD Dr. J. Wüst und Frau U. Hardegger, Medizinische Mikrobiologie Zürich, und Frau Dr. S. Tewes, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen Hannover, für die Hilfe bei den Abklärungen zur Identifikation des Keimes,

Herrn PD Dr. E. Eggenberger für die statistischen Berechnungen,

Meiner Frau Vreni und meinem Sohn Yves für die Geduld in dieser Zeit und die moralische Unterstützung.

10. Lebenslauf

|                  |                                                                                    |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 21.06.1958       | geboren in Wald ZH                                                                 |
| 1965 - 1971      | Primarschule in Mitlödi GL                                                         |
| 1971 - 1974      | Gymnasium in Glarus                                                                |
| 1974 - 1977      | Oberrealschule in Glarus                                                           |
| 1977             | Eidgenössische Maturität Typus C                                                   |
| 1978 - 1983      | Studium der Veterinärmedizin an der<br>Universität Zürich                          |
| 3.1984 - 9.1984  | Betriebstierarzt am<br>Biologischen Zentrallabor des<br>Universitätsspitals Zürich |
| 11.1984 - 2.1987 | Doktorand an der<br>Abteilung für Labortierkunde des<br>Instituts für Zuchthygiene |
| seit April 1987  | Assistent in einer Privatpraxis                                                    |



## 10. Lebenslauf

|                  |                                                                                    |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 21.06.1958       | geboren in Wald ZH                                                                 |
| 1965 - 1971      | Primarschule in Mitlödi GL                                                         |
| 1971 - 1974      | Gymnasium in Glarus                                                                |
| 1974 - 1977      | Oberrealschule in Glarus                                                           |
| 1977             | Eidgenössische Maturität Typus C                                                   |
| 1978 - 1983      | Studium der Veterinärmedizin an der<br>Universität Zürich                          |
| 3.1984 - 9.1984  | Betriebstierarzt am<br>Biologischen Zentrallabor des<br>Universitätsspitals Zürich |
| 11.1984 - 2.1987 | Doktorand an der<br>Abteilung für Labortierkunde des<br>Instituts für Zuchthygiene |
| seit April 1987  | Assistent in einer Privatpraxis                                                    |







